



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par L'institut National Polytechnique de Toulouse
Ecole doctorale : Mécanique, Energétique, Génie civil, & Procédés
Spécialité : Génie des Procédés et de l'environnement

Présentée et soutenue par

Luis Fernando Delgado Zambrano
Ingénieur de l'ENSGTI de Pau

Le 17 février 2009

Titre : Bioréacteur à membrane externe pour le traitement d'effluents contenant des médicaments anticancéreux: élimination et influence du cyclophosphamide et de ses principaux métabolites sur le procédé.

Jury

M. Michel Roques	Professeur, ENSGTI, Pau	Président
M ^{me} Christelle Wisniewski	Professeur, Université de Montpellier I	Rapporteur
M. Benoît Marrot	Maître de conférences (HDR), Université Paul Cézanne d'Aix-Marseille	Rapporteur
M ^{me} Sylvia Parathoen	Ingénieur – Pall Exekia	Examineur
M. Yvan Racault	Directeur de Recherche, Cemagref, Bordeaux	Examineur
M. Pierre Aimar	Directeur de Recherche CNRS, LGC, Toulouse	Examineur
M ^{me} Claire Albasi	Chargé de Recherche CNRS, LGC, Toulouse	Directrice

Unité de recherche : Laboratoire de Génie Chimique, UMR CNRS 5503

Résumé

La problématique concernant la présence et les risques potentiels liés aux micropolluants dans l'environnement est devenue une préoccupation d'actualité. Aujourd'hui, les stations d'épuration ne sont pas en mesure de traiter de manière adéquate ce nouveau type de pollution. Dans le cadre de cette thèse, l'application de la technologie des bioréacteurs à membrane a été envisagée afin d'évaluer leur potentiel pour la dégradation d'un médicament anticancéreux : le cyclophosphamide (CP). Les objectifs de cette étude sont d'une part évaluer le potentiel des bioréacteurs à membrane pour la dégradation du cyclophosphamide, ainsi que pour l'élimination de sa toxicité, d'autre part rechercher l'effet du CP et de ses métabolites sur les performances globales du procédé et sur l'activité de la biomasse épuratrice ainsi que sur les propriétés physico-chimiques de la liqueur mixte et les conséquences sur le colmatage. Deux âges de boues ont été évalués, 50 jours lors de la première campagne et 70 jours lors de la deuxième. L'élimination du CP et du métabolite 4-Keto-CP durant les deux campagnes expérimentales est d'environ 80% pour les deux composés. Les processus d'adsorption et de biodégradation contribuent à l'élimination du CP de l'eau résiduaire traitée. Le cocktail de CP et ces métabolites aux conditions opératoires étudiées n'a pas d'influence significative sur l'élimination globale de la DCO et de l'azote total. Cependant, la toxicité du cocktail des composés pharmaceutiques sur la boue activée modifie les caractéristiques de la matrice biologique : Une diminution de la production de boues du BÀM R1 CP par rapport au BÀM R2 contrôle est observée. La présence du CP et ses principaux métabolites stimule les mécanismes de survie et de production des EPS avec une production légèrement plus forte des polysaccharides que des protéines. Les résultats mettent en évidence que la réponse des boues activées des BÀM au cisaillement est dépendante de la présence de ces molécules. Cette étude démontre au final l'intérêt des BÀM pour traiter ce type d'effluents, et limiter la pollution relarguée dans le milieu naturel.

Mots clefs : Cyclophosphamide, bioréacteur à membrane, micropolluants, eau résiduaire

Abstract

In hospital or pharmaceutical discharges, but also in wastewater treatment plants and more generally in the aquatic environment, toxic pollutants have been identified. Some pharmaceuticals are not completely eliminated in the municipal wastewater treatment plants and are discharged as contaminants into receiving waters. The application of membrane bioreactor process is investigated here with the aim of evaluating the potential for removal of cyclophosphamide (CP). In this study, two membrane bioreactors (MBR) were operated: one of the MBR served as a control, whereas to the other CP and its main metabolites were continuously added. Two sludge retention times were assessed, 50 days and 70 days. Removal of CP in a MBR and its effects on the membrane performance, COD and total nitrogen (TN) removal efficiency were studied. CP and 4-Ketocyclophosphamide removals up to 80% were achieved under studied operating conditions. The sludge adsorption and biodegradation (cometabolism) play an important role in the process of CP removal. CP and its metabolites toxicity do not alter COD and total nitrogen removal efficiency of MBRs. However, it induces a modification of the biological suspended solids and in doing so a modification on the membrane fouling: a decrease in the production of sludge MBR CP compared to MBR control is observed; the presence of CP and its main metabolites stimulates mechanisms of protection and production of EPS with a slightly higher production of polysaccharides than proteins. The results underline that the response of activated sludge to shear stress is dependent on the presence of these molecules. This study demonstrates the interest of MBR to treat this type of effluent and reduce the pollution released into the environment.

Keywords: Cyclophosphamide; membrane bioreactor; micropollutants; wastewater.

Remerciements

Durant ces trois années de thèse, j'ai rencontré de nombreuses personnes qui m'ont aidé à mener à bien ce travail de recherche. Je tiens à remercier toutes celles qui ont participé d'une manière ou d'une autre à accomplir l'un de mes rêves : m'initier à la recherche scientifique. La liste est assez longue et ma mémoire est plutôt courte, alors j'espère n'oublier personne.

Je remercie :

Claire Albasi qui m'a accueilli au sein de l'équipe B&M dans le département BIOSYM du laboratoire de Génie Chimique et qui a encadré cette thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour ses conseils, sa disponibilité, son aide et son infinie patience, ainsi que pour la confiance qu'elle m'a toujours apportée.

Sylvie Schetrite d'avoir suivi avec beaucoup d'intérêt mon travail, de son aide, ses conseils, ses encouragements, sa disponibilité et de son soutien immense aux moments les plus difficiles durant ces trois années de thèse.

Alain Zarragoitia, mon ami, de sa bonne humeur, de son optimisme, des échanges très intéressants à propos de « la vie et de la science ». Je tiens à le remercier tout particulièrement de son logiciel *Respiroexpert* qui m'a permis de réduire considérablement le temps nécessaire pour analyser les résultats de respirométrie.

Les stagiaires dont les travaux ont directement contribué à cette étude : Camille « la petite fille », Anois « le fou », Ingrid « Catalana », Ingrid « française », « Juan Tren le vietnamien », Lenaïc, Max « le québécois », Amalia « la roumaine », Chadeli, Carlos « le vénézuélien », Awatef...

Cette thèse s'appuie sur des notions balayant un large panel des champs disciplinaires comme le génie des procédés, la microbiologie, l'écotoxicologie et la chimie analytique. Je souhaite donc remercier :

- Les partenaires du projet ANR « Toxeaub&M » :
Sylvia Paranthoen, Jacques Guibaud et Alain Balaire (Pall Exekia) pour leur aide dans l'aspect génie des procédés,
Virginie Faucet-Marquis et Annie Pfohl-Leszkowicz pour l'aspect écotoxicologie,
Bénédicte Marion, Christophe Dorandeu et Michel Audran pour l'aspect chimie analytique,
Sylvie Hansel, Annie Pfohl-Leszkowicz et Marcel Castegnaro pour l'aspect pharmacologie,
Christel Causserand et Wang Li pour l'aspect génie des procédés – traitement tertiaire.
- Catalina Avella, Tatiana Görner et Philippe Donato du laboratoire Environnement et Minéralurgie de l'université de Nancy pour leur collaboration permettant une étude approfondie des substances polymériques extracellulaires.

- Les permanents du département BIOSYM du laboratoire de Génie Chimique : Pierre Strehaiano, Patricia Taillandier, Marion Alliet, Régine Basseguy, Cédric Brandam, Audrey Devatine, Claire Joannis-Cassan pour l'aspect microbiologie - génie de procédés, et pour leurs conseils qui m'ont permis de mener à bien mon exposé de soutenance de thèse.

Je remercie les assistants ingénieur et les techniciens du laboratoire de génie chimique pour l'aide technique qui m'ont apporté durant toute la durée de mon étude : Bernand, Ignace, Christine Rey Rouch, Alain Muller, Jean Pierre Monna, Alain Philippe, Gilles Albert, Jean-Louis Nadalin, Denis Plotton.

Je remercie les nombreux chercheurs au laboratoire de Génie Chimique, venus d'ici ou d'ailleurs, avec qui j'ai pu partager et découvrir un peu de leur culture : Suhuttaya Jiranun (Tahiland), Maha, Nancy, Dominique, Youssef (Liban), Claudia, leo, sofia, Bibiana, José (Mexique), Caroline, Patricia, Andreina (Venezuela), Ulises, Ivon, Isa, Ariadna (que bola !!!, Cuba), Edison (Colombie), Noura, Hicham (Marroc), Amit, Nishan (Inde), Harold, Adrien, Pascal, Katy, Gaelle, Caroline, Mél (France), Inès, Marc, Mario (Espagne), Marianne, Christine (Québec), Cintia, Paolo (Brésil), Young Seob (Corée du Sud), Carmen (Roumanie), phong (Vietnam)

Je remercie vivement Madame le Professeur Christelle WISNIEWSKI de l'université Montpellier 1 et le Monsieur Benoît Marrot, Maître de Conférences de l'université Paul Cézanne d'Aix-Marseille, de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse.

Je tiens également à remercier Madame Sylvia Parathoen, Monsieur Yvan Racault, Monsieur le professeur Michel Roques et Monsieur Pierre Aimar d'avoir accepté de juger ce travail.

Je les remercie également de la discussion riche et intéressante qui s'est déroulée lors de la soutenance de ma thèse, de l'attention qu'ils ont bien voulu porter à ce travail et à la qualité de leurs remarques.

Je dédie ce travail

à ma famille,
à mi chimbita,
à la « madre tierra »,
à « pascual »,
à vous...

Table des Matières

	Page
Introduction	1
Chapitre I. Synthèse bibliographique	6
I. Problématique liée à la présence de produits pharmaceutiques dans l'environnement	7
1.1. Présence des médicaments dans l'environnement	7
1.2. Risques potentiels liés à la présence de produits pharmaceutiques aux concentrations retrouvées dans l'environnement	12
1.3. Les agents cytostatiques	15
1.3.1 Le Cyclophosphamide	17
1.4. Généralités sur la contribution des procédés de traitement dans l'élimination de micropolluants	20
1.5. Conclusion	21
II. Bioréacteurs à membrane et les phénomènes de colmatage	22
2.1 Les Bioréacteurs à Membrane (BàM)	22
2.1.1 Les bioréacteurs à membrane à boucle externe (BàME)	23
2.1.2 Les bioréacteurs à membranes immergées (BàMI)	24
2.2 Le colmatage dans les bioréacteurs à membrane	25
III. Elimination de micropolluants : sorption – Biodégradation	29
3.1 Adsorption de micropolluants	29
3.1.1 L'adsorption- Concepts généraux	29
3.1.2 La Bio-adsorption	29
3.1.3 Le coefficient d'adsorption	30
3.1.4 Capacités d'adsorption	31
3.1.5 L'adsorption des composés pharmaceutiques dans les stations d'épuration	32
3.2 Biodégradation de micropolluants	36
3.2.1 Estimation de la biodégradabilité de micropolluants	36
IV. Elimination des produits pharmaceutiques par des bioréacteurs à membrane	38
4.1. Mécanismes possibles d'élimination de produits pharmaceutiques par des bioréacteurs à membrane	38
4.2. Avantages potentiels des Bioréacteurs à membrane pour l'élimination de micropolluants	39
4.2.1. Aspects microbiologiques d'un bioréacteur à membrane	40

4.2.2	Comparaison entre les Bioréacteurs à membrane et les stations d'épuration classiques dans l'élimination de produits pharmaceutiques	41
4.3	Influence des conditions opératoires sur l'élimination de micropolluants pharmaceutiques polaires	47
4.3.1	Temps de séjour Hydraulique (TSH)	47
4.3.2	L'âge de boues	48
4.3.3	Le pH	49
4.3.4	Concentration en micropolluant à l'entrée du procédé	49
V.	Influence des conditions opératoires et de la toxicité sur l'activité microbienne et sur les performances d'un bioréacteur à membrane	50
5.1	Influence du stress hydrodynamique	50
5.2	Influence de l'âge de boue	51
5.3	Influence de la concentration en oxygène dissous	52
5.4	Influence de la toxicité	53
5.4.1	Influence des micropolluants sur des procédés de traitement biologique	55
5.4.2	Le rôle des substances polymères extracellulaires dans la réponse aux toxiques	57
VI.	Conclusions et objectifs	59
	 Chapitre II. Matériels et méthodes	 62
2.1	L'effluent	63
2.1.1	Caractéristiques de l'eau résiduaire urbaine	63
2.1.2	Caractéristiques du Viandox®	64
2.1.3	Composés pharmaceutiques utilisés	64
2.1.3.1	Système de sécurité vis-à-vis du cyclophosphamide	68
2.2	Description des pilotes	69
2.2.1	Bioréacteur	70
2.2.2	Module membranaire	71
2.3	Conditions opératoires	72
2.4.	Prélèvements des échantillons	73
2.5	Technique analytiques mises en œuvre	74
2.5.1	Analyses des MES	74
2.5.2	Mesure de la Demande Chimique en Oxygène (DCO)	75
2.5.3	Azote total	75
2.5.4	Dosage des exopolymères (EPS)	75
2.5.4.1	Protéines et des substances humiques	75
2.5.4.2	Polysaccharides	76
2.5.5	Evaluation du pouvoir colmatant d'une boue ou d'un surnageant	77
2.5.6	Mesure de la granulométrie de la boue	79
2.5.7	Microscope confocal	80
2.5.8	Détection et quantification du Cyclophosphamide (CP) et 4-Keto CP	81

2.6	Suivi de l'activité biologique	82
2.6.1	Description de l'installation	83
2.6.1.1	Les solutions utilisées	84
2.6.2	Obtention d'un respirogramme	84
2.7.	Test d'adsorption du cyclophosphamide sur la boue du bioréacteur à membrane	88
2.8	Fonctionnement des pilotes	89
2.8.1	Considérations générales	89
2.8.2	Les bioréacteurs à membranes fonctionnent-ils en parallèle ?	90
Chapitre III. Influence du Cyclophosphamide et de ses principaux métabolites sur les performances globales du procédé et sur l'activité de la biomasse épuratrice		96
3.1	Charge volumique et concentration en DCO à l'entrée des bioréacteurs	97
3.2	Influence du Cyclophosphamide et de ses principaux métabolites sur le rendement d'élimination de la DCO	100
3.2.1	Âge de Boues 50 jours	100
3.2.2	Âge de Boues 70 jours	103
3.2.3	Discussion	106
3.3	Influence du Cyclophosphamide et de ses principaux métabolites sur l'élimination de l'azote total	106
3.3.1	Discussion	109
3.4	Evolution des matières en suspension (MES) et du rendement de production de boues	110
3.5	Influence du Cyclophosphamide et ses principaux métabolites sur l'activité biologique	114
3.5.1	Effet à concentration élevée et à court temps d'exposition	115
3.5.1.1	Effet sur l'activité suite à une injection (pulse) de toxiques	116
3.5.1.2	Effet sur l'activité biologique durant 4 jours d'exposition	117
3.5.2	Effet des composés pharmaceutiques étudiés sur la biomasse épuratrice à long terme	118
3.5.2.1	Microorganismes hétérotrophes	121
3.5.2.1.1	Effets sur la respiration endogène	121
3.5.2.1.2	Effets sur la respiration exogène	122
3.5.2.2	Microorganismes autotrophes	124
3.5.2.2.1	Effets sur la respiration endogène	125
3.5.2.2.2	Effets sur la respiration exogène	125
3.5.2.3	Discussion	126
3.6	Conclusion	128

Chapitre IV. Influence du Cyclophosphamide et de ses principaux métabolites sur les propriétés physico-chimiques de la liqueur mixte ; conséquences sur le colmatage	130
4.1 Influence du Cyclophosphamide et de ses principaux métabolites sur la concentration et la nature des exopolymères dans le surnageant du Bioréacteur à membrane	131
4.1.1 Campagne expérimentale I. Âge de Boues 50 Jours	131
4.1.2 Campagne expérimentale II. Âge de Boues 70 Jours	140
4.2 Influence du cocktail pharmaceutique sur la taille de floccs	142
4.3 Conséquences des modifications de la liqueur mixte sur le colmatage de la membrane	145
4.3.1 Campagne expérimentale I. Âge de boues 50 jours	145
4.3.1.1 Relation entre les exopolymères et le caractère colmatant de la boue activée	148
4.3.1.2 Discussion	151
4.3.2 Campagne Expérimentale II. Âge de boues 70 jours	153
4.3.2.1 Discussion	158
4.4 Synthèse et conclusion	159
Chapitre V. Performance d'un bioréacteur à membrane externe pour l'élimination du Cyclophosphamide et de la toxicité liée à ses principaux métabolites	162
5.1 Performance du bioréacteur à Membrane BAM-R1-CP pour l'élimination du Cyclophosphamide	163
5.2 Influence de la concentration en MES et de la concentration en CP à l'entrée du procédé sur le pourcentage d'élimination du CP.	168
5.3 Test d'adsorption et stabilité de la molécule	172
5.4 Discussion	174
5.5 Test de génotoxicité et de cytotoxicité	179
5.5.1 Tests de cytotoxicité	179
5.5.2 Test de génotoxicité	180
5.6 Conclusions	184
Conclusions et Perspectives	187
Références bibliographiques	193
Annexes	212

Liste des Figures

	page
Chapitre I	
Fig. 1.1. Sources et voies possibles de la présence de résidus de produits pharmaceutiques dans l'environnement aquatique (d'après Heberer, 2002)	9
Figure 2.1.1.1 Schéma d'un Bioréacteur à membrane Externe	23
Figure 2.1.2.1 Schéma d'un Bioréacteur à membranes immergées	24
Figure 2.1.2.2 Schéma d'un Bioréacteur à membrane à filtration semi-frontale avec module externe	25
Figure 2.2.1. Schéma des différents mécanismes de colmatage	26
Figure 3.2.1.1. Constantes de cinétiques de dégradation de 35 produits pharmaceutiques, hormones et produits cosmétiques observés pour les boues d'une station d'épuration municipale avec des âges de boues ≥ 8 jours	38
Chapitre II	
Figure 2.1.3.1 Structure du Cyclophosphamide : bis (2-chloroethyl)-1, 3,2-oxazaphosphinan-2-amine 2-oxide. Formule chimique : $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$	64
Figure 2.1.3.2 Schéma du métabolisme humain du Cyclophosphamide.(Huitema et al., 2001).	67
Figure 2.1.3.1.1 Système de sécurité installé sur les pilotes. (a) Hotte aspirante. (b) écran protecteur. (C) Gants (d) Bacs de rétention	69
Figure 2.2.1 Schéma des bioréacteurs à membrane externe utilisés durant cette étude	70
Figure 2.5.5 Schéma de l'expérience pour l'évaluation du pouvoir colmatant d'une boue ou d'un surnageant	77
Figure 2.5.6. Granulomètre laser Mastersizer 2000	80
Figure 2.6.1. Schéma du Respiromètre	84
Figure 2.6.2.1 (a).Exemple de respirogramme. Campagne expérimentale I. R : Respiration. Exo : exogène. A : Autotrophes. H : Hétérotrophes	87
Figure 2.6.2.1 (b).Exemple de respirogramme. Campagne expérimentale II. R : Respiration. Exo : exogène. A : Autotrophes. H : Hétérotrophes	87
Figure 2.8.2.1 Evolution du pourcentage d'élimination de la DCO en fonction du temps pour les deux bioréacteurs. Campagne expérimentale II avant l'ajout du cocktail	91
Figure 2.8.2.2 Evolution de la concentration en matière en suspension (MES) en fonction du temps pour les deux bioréacteurs. Campagne expérimentale II avant l'ajout du cocktail	91
Figure 2.8.2.3 Evolution de la concentration en DCO dans le surnageant et dans le perméat en fonction du temps pour les deux bioréacteurs. Campagne expérimentale II avant l'ajout du cocktail	92
Figure 2.8.2.4 Evolution du diamètre volumétrique moyen (μm) en fonction du temps pour les deux bioréacteurs. Campagne expérimentale II avant l'ajout du cocktail	92

Figure 2.8.2.5	Evolution de la pression transmembranaire (PTM) en fonction du temps pour les deux bioréacteurs. Campagne expérimentale II avant l'ajout du cocktail	93
Figure 2.8.2.6	Evolution de la concentration en polysaccharides dans le surnageant et dans le perméat en fonction du temps pour les deux bioréacteurs. Campagne expérimentale II avant l'ajout du cocktail	93
Figure 2.8.2.7	Evolution du produit αC en fonction du temps pour les deux bioréacteurs. Campagne expérimentale II avant l'ajout du cocktail	94
Figure 2.8.2.8	Evolution de la respiration endogène hétérotrophe en fonction du temps pour les deux bioréacteurs. Campagne expérimentale II avant l'ajout du cocktail	94
Figure 2.8.2.9	Evolution de la respiration exogène maximale hétérotrophe en fonction du temps pour les deux bioréacteurs. Campagne II avant l'ajout du cocktail	95

Chapitre III

Figure 3.1.1	Variations des charges volumiques dans les deux réacteurs.(a) campagne I, (b) campagne II	98
Figure 3.1.2	(a) Concentration en DCO à l'entrée et à la sortie des pilotes dans le temps. Campagne expérimentale I. Âge de Boues 50 jours	99
Figure 3.1.2	(b) Concentration en DCO à l'entrée et à la sortie des pilotes dans le temps. Campagne expérimentale II. Âge de Boues 70 jours	99
Figure 3.2.1.1	Evolution des DCO dans les surnageant des deux Bioréacteurs. Campagne expérimentale I	101
Figure 3.2.1.2	Evolution du pourcentage d'épuration de la DCO des deux Bioréacteurs.	102
Figure 3.2.1.3	Evolution des pourcentages de rétention de la DCO par la membrane. Campagne expérimentale I	103
Figure 3.2.2.1	Evolution des DCO dans les surnageant des deux Bioréacteurs. Campagne expérimental II	104
Figure 3.2.2.2	Pourcentage de rétention de la DCO par la membrane dans le temps. Campagne expérimental II	105
Figure 3.2.2.3	Evolution du pourcentage d'épuration de la DCO des deux Bioréacteurs. Campagne expérimentale II	105
Figure 3.3.1	Evolution de l'azote total à l'entrée et à la sortie des deux Bioréacteurs. Campagne expérimental I	107
Figure 3.3.2	Evolution de l'azote total à l'entrée et à la sortie des deux Bioréacteurs. Campagne expérimental II	108
Figure 3.3.3	Evolution du pourcentage d'élimination de l'azote total des deux Bioréacteurs (a) Âge de boues 50 jours (b) Âge de Boues 70 jours	108
Figure 3.4.1.1	Evolution des matières en suspensions dans les deux BÀM. Campagne expérimentale I. âge de boues 50 jours	110
Figure 3.4.1.2	Evolution des matières en suspensions dans les deux BÀM. Campagne expérimentale II. Âge de boues 70 jours	111
Figure 3.4.1.3	Production de boues cumulée dans les deux BÀM. Campagne expérimentale I. âge de boues 50 jours	112
Figure 3.4.1.4	Rendement de production de Boues	113
Figure 3.5.1.1	Evolution de la vitesse de consommation d'oxygène dans le temps. Test évaluant l'effet sur l'activité suite un pulse de toxiques	116

Figure 3.5.1.2 Evolution de la vitesse de consommation d'oxygène dans le temps. Test évaluant l'effet sur l'activité biologique durant 4 jours d'exposition	118
Figure 3.5.2.1.1 (a) Rapport respiration endogène spécifique de microorganismes hétérotrophes. Campagne expérimentale I. Âge de Boues 50 jours	121
Figure 3.5.2.1.1 (b) Rapport respiration endogène spécifique de microorganismes hétérotrophes. Campagne expérimentale II. Âge de Boues 70 jours	122
Figure 3.5.2.1.2 (a) Rapport respiration exogène spécifique de microorganismes hétérotrophes. Campagne expérimentale I. Âge de Boues 50 jours	123
Figure 3.5.2.1.2 (b) Rapport respiration exogène spécifique de microorganismes hétérotrophes. Campagne expérimentale II. Âge de Boues 70 jours	124
Figure 3.5.2.2.1 Evolution de la respiration endogène dans le temps. Campagne expérimentale II. Âge de Boues 70 jours. Microorganismes autotrophes	125
Figure 3.5.2.2.2 Evolution de la respiration Exogène dans le temps. Campagne expérimentale II. Âge de Boues 70 jours. Microorganismes autotrophes	126

Chapitre IV

Figure 4.1.1.1 Evolution de la concentration en protéines dans le surnageant et dans le perméat des Bioréacteurs, BÂM R1 CP et BÂM R2 contrôle. Campagne I	132
Figure 4.1.1.2 Evolution de la concentration en substances humiques dans le surnageant et dans le perméat des Bioréacteurs. Campagne expérimentale I	133
Figure 4.1.1.3 Evolution de la concentration en polysaccharides dans le surnageant et dans le perméat des Bioréacteurs, BÂM R1 CP et BÂM R2 contrôle. Campagne expérimentale I	133
Figure 4.1.1.4 Campagne expérimentale I. Evolution du pourcentage de rétention par la membrane des substances humiques	135
Figure 4.1.1.5 Campagne expérimentale I. Evolution du pourcentage de rétention par la membrane des polysaccharides	136
Fig. 4.1.1.6. Chromatogrammes Normalisés de EPS solubles présents dans le surnageant (A et D) et dans le perméat (B et E) et les chromatogrammes normalisés de EPS liées (C et F) dans les réacteurs	138
Figure 4.1.2.1 Campagne expérimentale II. : Evolution de la concentration en protéines dans le surnageant et dans le perméat des Bioréacteurs	140
Figure 4.1.2.2 Evolution de la concentration en substances humiques dans le surnageant et dans le perméat des Bioréacteurs. Campagne expérimentale II	140
Figure 4.1.2.3 Evolution de la concentration en polysaccharides dans le surnageant et dans le perméat des Bioréacteurs. Campagne expérimentale II	141
Figure 4.2.1 (a) Evolution du diamètre moyen de flocs des deux bioréacteurs (répartition en volume) en fonction du temps. Campagne expérimentale I	142
Figure 4.2.1 (b) Evolution du diamètre moyen de flocs des deux bioréacteurs (répartition en volume) en fonction du temps. Campagne expérimentale II	142

Figure 4.2.2	Evolution dans le temps du rapport entre diamètres moyens des Bioréacteurs : BÀM R1 CP / BÀM R2 contrôle. Campagne expérimentale II	143
Figure 4.2.3	Observations au microscope confocal des boues issues des deux bioréacteurs. Campagne expérimentale II	144
Figure 4.3.1	(a) Campagne expérimentale I. Evolution dans le temps de la pression transmembranaire des deux bioréacteurs	146
Figure 4.3.1	(b) Distributions des tailles de floes. Jours 21 (avant l'ajout du cocktail), 39 (après l'adjonction du cocktail) et 81 (après le changement de la vitesse tangentielle) de la campagne expérimentale I	147
Figure 4.3.1	(c) Campagne expérimentale I. Comparaison du pouvoir colmatant de la boue activée des deux bioréacteurs : α C BÀM R1 CP en fonction de α C BÀM R2 contrôle	148
Figure 4.3.1	(d) Evolution du produit α C et du facteur MFI du surnageant dans les deux réacteurs en fonction du temps durant les 80 premiers jours de fonctionnement. Campagne expérimentale I	149
Figure 4.3.1	(e) Evolution du produit α C du surnageant des deux bioréacteurs en fonction de la concentration en exopolymères solubles. Prélèvements faits les jours 53, 59, 66, 80 durant la Campagne expérimentale I. A gauche BÀM R1 CP. A droite BÀMR2 Contrôle	149
Figure 4.3.1	(f) Evolution de la concentration en polysaccharides et du produit α C de la boue en fonction du temps pour les deux bioréacteurs durant les 80 premiers jours de fonctionnement. A gauche, relation entre la concentration en polysaccharides solubles et le produit α C de la boue activée	150
Figure 4.3.2	(a) Evolution dans le temps de la pression transmembranaire des deux bioréacteurs. Campagne expérimentale II	154
Figure 4.3.2	(b) Campagne expérimentale II. Evolution du pourcentage de rétention par la membrane des substances humiques (à gauche) et des polysaccharides (à droite) dans le temps pour les des deux bioréacteurs	155
Figure 4.3.2	(c) Comparaison du pouvoir colmatant de la boue activée des deux bioréacteurs : α C BÀM R2 contrôle en fonction de α C BÀM R1 CP. Campagne expérimentale I	156
Figure 4.3.2	(d) Evolution du produit α C de la boue activée des deux bioréacteurs en fonction du temps. Campagne expérimental I	156
Figure 4.3.2	(e) Distributions des tailles de floes. Jours 191 (vitesse tangentielle égale à 5m/s), 206 (vitesse tangentielle égale à 4 m/s) et 209 (vitesse tangentielle égale à 4m/s) de la campagne expérimentale II	158

Chapitre V

Figure 5.1.1	(a) Evolution de la concentration en CP à l'entrée, dans le surnageant et dans le perméat du bioréacteur BAM R1 CP dans le temps durant la campagne expérimentale I	164
Figure 5.1.1	(b) Evolution de la concentration en CP à l'entrée, dans le surnageant et dans le perméat du bioréacteur BAM R1 CP dans le temps durant la campagne expérimentale II	164

Figure 5.1.2	(a) Evolution du pourcentage d'élimination du CP en fonction du temps lors de la première campagne expérimentale	165
Figure 5.1.2	(b) Evolution du pourcentage d'élimination du CP en fonction du temps lors de la deuxième campagne expérimentale	166
Figure 5.1.3	Evolution du pourcentage d'élimination du CP en fonction du temps lors des deux campagnes expérimentales	167
Figure 5.1.4	Evolution de la concentration en MES dans le réacteur et de la concentration en CP à l'entrée en fonction du temps	167
Figure 5.1.5	Evolution de la concentration en MES dans le réacteur et du pourcentage d'élimination du CP en fonction du temps. Campagne expérimentale I (a), campagne expérimentale II (b). A droite, pourcentage d'élimination en fonction de la concentration en MES	169
Figure 5.1.6	Pourcentage d'élimination du CP en fonction de la concentration en CP à l'entrée du BAM R1 CP. Campagne expérimentale II	170
Figure 5.1.7	Pourcentage d'élimination du CP en fonction de la concentration à l'entrée durant la première campagne expérimentale	170
Figure 5.3.1	Isotherme d'adsorption du cyclophosphamides	174
Figure 5.4.1	Evolution de la concentration en 4-Keto-CP en fonction du temps durant les deux campagnes expérimentales	175
Figure 5.4.2	Evolution de la toxicité dans le surnageant et dans le perméat du BAM R1 CP et de la pression transmembranaire en fonction du temps. (a) Cytotoxicité ou prolifération (b) génotoxicité	182
Figure 5.4.3	Evolution de la toxicité dans le surnageant et dans le perméat du BAM R1 CP et de la concentration en substances humiques et en polysaccharides au cours du temps. (a) Cytotoxicité ou prolifération (b) génotoxicité	183

Liste des tableaux

	page
 Chapitre I	
Tableau 1.1. Les composés pharmaceutiques les plus fréquents dans l'environnement	8
Tableau 1.2. Concentrations de composés pharmaceutiques retrouvés dans de l'eau potable	12
Tableau 3.1.5.1. Coefficients de sorption pour des boues d'une station d'épuration municipale, mesurés en expériences Batch et le coefficient de distribution Octanol-eau	34
Tableau 4.2.2.1. Coefficients de sorption de boues activées K_D et des constantes de vitesse de dégradation observée k_{biol} en expériences batch avec des boues activées d'une station d'épuration des eaux usées municipales (Joss et al., 2006)	44
Tableau 4.2.2.2. Pourcentages moyen d'élimination pour certains composés pharmaceutiques par Bioréacteur à Membrane (BàM) et par Boues Activées (BA). (Radjenovic et al., 2007 ; Bernhard et al., 2006)	46
 Chapitre II	
Tableau 2.1.1 Concentrations moyennes en DCO, Azote et MES de l'eau résiduaire de Brax durant les campagnes expérimentales	63
Tableau 2.1.2 Concentrations moyennes en DCO et en Azote soluble dans la solution Viandox® diluée durant les campagnes expérimentales	64
Tableau 2.1.3.1 Stabilité du cyclophosphamide (Gilard et al., 1994)	65
Tableau 2.1.3.2 Concentrations ciblées à l'entrée du BÀM R1 CP du Cyclophosphamide et ses principaux métabolites	67
Tableau 2.1.3.1.1 Equipe de protection pour diminuer les risques associés au cyclophosphamide et ses métabolites	68
Tableau 2.2.2 Caractéristiques des membranes utilisées	71
Tableau 2.3 Conditions opératoires des bioréacteurs à membrane durant les deux campagnes expérimentales	73
Tableau 2.5.8.2 Limites de détection de la méthode d'analyse	82
Tableau 2.6.2.1(a) Protocole d'analyse. Respirométrie durant la première Campagne expérimentale	85
Tableau 2.6.2.1(b) Protocole d'analyse. Respirométrie durant la deuxième Campagne expérimentale	86
 Chapitre III	
Tableau 3.1.1 Valeurs moyennes de la DCO à l'entrée et de la charge volumique imposée	100
Tableau 3.5.1 Concentrations en composés pharmaceutiques dans le respiromètre. Test évaluant les effets du cocktail à court temps d'exposition	115
Tableau 3.5.1.1 Consommation d'oxygène pour l'assimilation du substrat exogène ajouté. Test évaluant l'effet sur l'activité suite un pulse de toxiques	117
Tableau 3.5.2 Concentration en MES et quantité de substrat ajouté. Test respirométrie durant les deux campagnes expérimentales	120

Chapitre V

Tableau 5.3.1. Adsorption du CP sur la boue activée du BAM R2 Contrôle	173
Tableau 5.4.1 Estimation de la contribution du processus d'adsorption et de biodégradation sur l'élimination du CP	178

Nomenclature

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AFSSET	Agence française de sécurité sanitaire de l'Environnement et du travail
ANR	Agence Nationale de la Recherche
ATO	Adenosine triphosphate
ATU	Allylthiourée
BÀM ou BàM	Bioréacteur à Membrane
BA	Boues Activées
BàM R1 CP	Bioréacteur à membrane en présence du cyclophosphamide et ses principaux métabolites humains
BàM R2 Contrôle	Bioréacteur à membrane contrôle
BAME	bioréacteur à membrane externe
BAMI	bioréacteur à membranes immergées
BSA	Sérum albumine bovine
CNRS	Centre nationale de la recherche scientifique
CP	Cyclophosphamide
DCCP	Deschloroethylcyclophosphamide
ERU	eaux résiduaires urbaines
FT IS	Fourier transformed infrared spectroscopy ou Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
HPSEC	High pressure size exclusion chromatography ou chromatographie d'exclusion de taille
INP	Institut nationale polytechnique
LGC	Laboratoire de Génie Chimique
STEP	Station d'épuration
TSH	Temps de séjour hydraulique
UMR	Unité mixte de recherche

Lettres latines

AB	âge de boue	j
b	constante de décroissance cellulaire	j ⁻¹
C _m	charge massique	gDCO/gMES.j
C _v	charge volumique	gDCO/L/j
DCO	demande chimique en oxygène	mg/L
dp	diamètre des particules	μm
EPS	substances exopolymériques	mg/L
EPS _{liés}	teneur en exopolymères dans les floccs	mg/L
J	flux de perméat	m ³ /m ² .s
<i>k_{Biol}</i>	constante de vitesse de réaction	L/g/j
K _D	coefficient adsorption spécifique	L/ kgMES
k _f	constante de <i>Freundlich</i>	
K _{OC}	coefficient de partage carbone organique/eau	L/Kg Carbone organique
K _{OM}	coefficient d'adsorption relatif au taux de matière organique	L/KgMVS
K _{OW}	coefficient de partage Octanol-eau	
MES	matières en suspension	g/L ou kg./m ³
MFI	membrane Fouling index ou indice de colmatage de la membrane	s/m ⁶
MVS	matières volatiles en suspension	g/L ou kg./m ³
P	pression	bar
P _x	production journalière de boues	g/j
PTM	pression transmembranaire	bar
Q _p	débit de purge	L/j
R	résistance de colmatage	m ⁻¹
R _a	résistance de colmatage due à l'adsorption	m ⁻¹

R_d	résistance de colmatage due à un dépôt de matière	m^{-1}
R_m	résistance membranaire	m^{-1}
R_{pol}	résistance de colmatage due à la couche limite de polarisation	m^{-1}
t	temps	s
V_R	volume de réacteur	L
Y_{obs}	rendement de production de boues observée	g MES/g DCO

Lettres grecques

α	résistance spécifique	m/kg
ρ	masse volumique	Kg/ m^3
μ	viscosité dynamique	m^2/s
Ω	surface membranaire	m^2

Introduction

La protection de l'eau de surface comme source pour la production d'eau potable est devenue une question importante pour la société. Le cycle complet de l'eau est une partie essentielle de la gestion à long terme des ressources d'eau, exigeant de protéger les eaux de surface des composés polluants persistants, ces derniers étant difficiles à enlever et/ou toxiques.

Les effets engendrés par certains polluants peuvent être de type aigus (= toxicité aigüe), c'est-à-dire des altérations des fonctions vitales, ou la mort provoquées par des expositions (sur un temps court) à de fortes doses d'une substance toxique. Ils peuvent être aussi de type chronique (= toxicité à long terme) engendrant des altérations des fonctions physiologiques (croissance, reproduction) provoquées par des expositions (sur le long terme) à de faibles doses d'une substance toxique.

Récemment, une attention croissante est portée sur la présence de micropolluants dans l'environnement aquatique et dans les stations d'épuration. Les micropolluants sont des polluants susceptibles d'avoir un effet sur l'environnement même à des concentrations basses. Ils sont souvent présents dans l'environnement aquatique à des concentrations très faibles ($\mu\text{g/L}$, ng/L) par rapport à d'autres polluants (mg/L).

Les micropolluants dans l'environnement aquatique sous forme initiale ou métabolisée posent le double problème de la quantification de leur toxicité et des voies possibles de leur élimination. Aujourd'hui, cette préoccupation ne fait l'objet d'aucune législation, ni en France ni ailleurs dans le monde, même si les pouvoirs publics commencent à s'y intéresser (Mission de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail en cours sur les anticancéreux, AFSSET).

Ce terme regroupe une grande famille de composés chimiques : détergents, produits de nettoyages, additifs des plastiques, hydrocarbures, pesticides, herbicides, retardateurs de flamme, inhibiteur de corrosion, métaux lourds, agents tensio-actifs anioniques, cosmétiques, parfums, **médicaments**, hormones, et leurs métabolites.

La présence de composés pharmaceutiques dans les effluents des stations d'épuration a été rapportée dans plusieurs études (Steger-Hartmann et al., 1997 ; Joss et al., 2005 ; Bernhard et al., 2006 ; De Wever H et al., 2007). Le caractère spécifique de ces composés, mis sur le marché au terme d'une sélection rigoureuse ne retenant que les molécules biologiquement les plus actives, leur confère un statut particulier (Joyeux, 2006). La dimension du problème est d'autant plus

importante qu'au niveau européen, chaque année, des milliers de tonnes de médicaments pour l'homme et des médicaments vétérinaires, sont excrétés sous forme inchangée ou sous la forme des métabolites actifs (Heberer, 2002). Pour certains médicaments, les niveaux d'utilisation par pays ne dépassent pas quelques centaines de kilogrammes, pour d'autres en revanche, ils se chiffrent en centaines voire en milliers de tonnes (Joyeux, 2006). En Angleterre, en Allemagne, et en Autriche, certains produits pharmaceutiques sont utilisés en quantités de plus de 100 tonnes par année (Moldovan, 2006; Jones et al., 2002; Huschek et al., 2004). Des anti-inflammatoires, y compris l'acide acétylsalicylique (836 t en Allemagne en 2001), paracétamol (622 t en Allemagne en 2001), l'ibuprofène (345 t en Allemagne en 2001), le naproxène (35 t en Angleterre en 2000) et le diclofénac (86 t en Allemagne en 2001) ; la metformine (517 t en Allemagne en 2001) et la carbamazépine (88 t en Allemagne 2001) sont quelques exemples des produits pharmaceutiques les plus communément utilisés (Fent et al., 2006).

La plupart des traitements biologiques des eaux usées ne sont pas en mesure d'éliminer efficacement ces produits pharmacologiquement actifs (Castiglioni et al., 2005, 2006). Cela, ajouté à une mauvaise élimination des médicaments périmés, contribue à la contamination des environnements aquatiques d'eau douce par des produits pharmaceutiques (Zuccato et al., 2000). De plus, le fait que ces molécules soient déversées continuellement dans les milieux aquatiques leur confère une apparente persistance y compris ceux possédant une demie vie brève (Daughton et Ternes, 1999 ; Joyeux, 2006). L'élimination de ces composés, particulièrement pendant le traitement de potabilisation de l'eau est difficile et coûteux. Par conséquent, il est nécessaire d'envisager un traitement plus efficace par les stations d'épuration afin de les éliminer (Bernhard et al., 2006).

Actuellement, plusieurs études sont menées afin d'étudier et d'optimiser l'élimination des produits pharmaceutiques par des bioréacteurs à membrane (BàM). Bien qu'il soit généralement accepté que les performances des bioréacteurs à membrane sont meilleures que celles des stations d'épuration classiques pour la dégradation biologique de la matière organique (Xing et al., 2001 ; Lee et al., 2003 ; Yoon S.H, 2003 ; Lesjean et al., 2004b ; Chen et al., 2008), leurs caractéristiques par rapport aux micropolluants sont beaucoup moins documentées.

Le bioréacteur à membrane résulte du couplage entre un traitement biologique et une séparation liquide/solide par membrane. Le temps de séjour hydraulique et l'âge de boues sont totalement découplés et offrent aux BàM une grande flexibilité d'opération. Les bioréacteurs à membrane

opèrent généralement à des âges de boues élevés et à des concentrations fortes en biomasse, permettant l'intensification des processus biologiques, ce qui peut favoriser l'élimination de contaminants ayant des caractéristiques particulières, telles que leur faible bio-dégradabilité, et leur faible concentration.

Cette étude fait partie d'un projet ANR nommé « Toxeaubam » regroupant 2 laboratoires et un groupe industriel, Pall Exekia et une société de consultance. Les objectifs scientifiques affichés du projet sont d'une part, l'élimination d'une molécule anticancéreuse toxique dans l'eau par couplage bioréacteur à membrane et nanofiltration et d'autre part, le développement d'une stratégie permettant d'évaluer le risque éco-toxicologique. Ces méthodes seront appliquées dans la mesure de leur sensibilité à la sortie du bioréacteur, pour en évaluer la capacité à dépolluer des eaux chargées en composés pharmaceutiques. Chaque acteur de ce projet a une tâche bien définie, répartie comme suit :

- I. Laboratoire de Génie chimique (UMR, CNRS, INP Toulouse).
 - Suivi des bioréacteurs à membrane externe (L.F Delgado, S. Schetrite, Claire Albasi)
 - Evaluation de la toxicité (V. Faucet-Marquis, A. Pfohl-Leszkowicz)
 - Traitement tertiaire, Nanofiltration, osmose inverse (C Causserand, Wang Li)
- II. Laboratoire de Biophysique et bio-analyse (Université de Montpellier)
 - Dosage chimique du Cyclophosphamide et métabolites (B. Marion, C. Dorandeu, M Audran, S. Hansel)
 - Accès aux services hospitalier et de pharmacie.
- III. Consultant IARC (International Agency for Research on Cancer, M. Castegnaro).
Expérience, sécurité et prélèvements d'échantillons à l'hôpital.
- IV. Pall Exekia, Consultants et fournisseur des bioréacteurs à membrane (S. Paranthoen, A Balaire, J Guibaud). Expérience en bioréacteurs à membrane et en traitement des effluents pharmaceutiques.

Dans le cadre de cette thèse, l'application de la technologie des bioréacteurs à membrane est envisagée ici afin d'évaluer leur potentiel pour la dégradation d'un médicament anticancéreux. La molécule cible choisie dans le cadre de cette étude, le cyclophosphamide (CP), est majoritairement employée dans les thérapies anticancéreuses et possède des propriétés génotoxiques pour tout individu ou organisme vivant (Gilard et al., 1994 ; Steger-Hartmann et al., 1997).

Au-delà de l'élimination (chimique et de sa toxicité) du CP et de ses métabolites, l'objectif de l'étude est aussi de rechercher l'effet de ces composés sur les performances globales du procédé et sur l'activité de la biomasse épuratrice ainsi que sur les propriétés physico-chimiques de la liqueur mixte et les conséquences sur le colmatage. Ce manuscrit rapportant l'ensemble des résultats est ainsi organisé en 5 chapitres :

Le premier chapitre expose, à travers une synthèse bibliographique, une présentation de la problématique liée à la présence de produits pharmaceutiques dans l'environnement et les risques potentiels associés à ces produits, ainsi que les mécanismes possibles de l'élimination de molécules pharmaceutiques par des bioréacteurs à membrane (sorption, biodégradation), l'influence de conditions opératoires sur leur élimination et finalement l'influence de la toxicité sur l'activité microbienne et sur les performances du procédé.

Le deuxième chapitre présente les pilotes expérimentaux et ses conditions de fonctionnement, ainsi que les différentes analyses effectuées en parallèle.

Le chapitre III est focalisé sur les résultats expérimentaux caractérisant l'influence du cyclophosphamide et de ses principaux métabolites sur les performances globales du procédé et sur l'activité de la biomasse épuratrice.

Dans le chapitre IV les résultats ayant permis l'étude de l'influence du cyclophosphamide et de ses principaux métabolites sur les propriétés physico-chimiques de la liqueur mixte et les conséquences sur le colmatage, sont présentés et discutés.

Le chapitre V conclura cette étude par l'étude des performances d'élimination (quantification chimique) et de la toxicité associée du Cyclophosphamide et de ses principaux métabolites par le Bàm, à deux âges de boues élevés (50 et 70 jours).

A la fin de ce manuscrit, la conclusion rassemble les résultats essentiels et propose des voies possibles de poursuite des investigations.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I. Problématique liée à la présence de produits pharmaceutiques dans l'environnement

1.1. Présence des médicaments dans l'environnement

Les premiers rapports sur les produits pharmaceutiques dans les eaux résiduelles et dans les eaux de surface ont été publiés aux États-Unis dans les années 70. Dans un premier temps les produits pharmaceutiques vus comme des contaminants de l'environnement n'ont pas reçus beaucoup d'attention jusqu'à ce que, le lien a été fait entre le pharmaceutique ethynylestradiol et ses effets sur les poissons (Kim et al., 2007).

Depuis, une attention scientifique à été particulièrement dédiée à la présence de produits pharmaceutiques dans l'environnement. Ceci a abouti à un nombre croissant de détection de produits pharmaceutiques dans une variété d'échantillons de l'environnement, par exemple les effluents des station d'épuration (STEP), les eaux de surface, les eaux souterraines (Zuccato et al., 2000; Jones et al., 2001 ; Kümmerer, 2001 ; Ternes, 2001; Heberer, 2002; Calamari et al., 2003; Ferrari et al., 2003 ; Tixier et al., 2003 ; Paxeus, 2004; Carlsson et al., 2006; Gros et al, 2006), l'eau potable (Reddersen et al, 2002) et l'eau de mer (carbamazépine 2ng/L, propyphénazone 0.6 ng/L et l'acide clofibrique 7.8 ng/L ont été mesurés en mer du Nord (Buser et al, 1998 ; Weigel et al, 2002).

Plus de 150 produits pharmaceutiques de différentes classes thérapeutiques ont été détectés jusqu'au µg/L dans diverses matrices environnementales (Heberer, 2002 ; Gros et al, 2006), incluant une grande variété de composés : hormones, régulateurs de lipides, antibiotiques, anticancéreux et d'autres cytotoxiques, antiépileptiques, etc.

Le tableau 1.1 regroupe quelques composés parmi ceux le plus souvent retrouvés dans l'environnement.

Tableau 1.1. Composés pharmaceutiques les plus fréquents dans l'environnement. D'après Halling-Sorensen et al., 1998 ; Daughton et Ternes, 1999 ; Hirsch et al, 1999, Hernando et al., 2006.

Groupe	Produit Pharmaceutique
Antibiotiques	Oflaxacin, Chlortetracycline, Oxytetracycline, Streptomycin, Flumequine, Ciprofloxacine, Trometoprim, Lincomycin, Penicillin, Lincomycin, Amoxycillin, Spiramycin. Azithromycin, Clarithromycin, Erythromycin, N4-Acetyl-Sulfamethoxazole, Sulfamethoxazole, Roxithromycin, Sulfamethazin.
Antidépresseurs	Mianserin
Tranquillisants	Diazepam
Antiépileptiques	Carbamazepine
Anti-inflammatoires/ Analgésiques	Acide Acetylsalicylique (Aspirin), Diclofenac, Ibuprofène, Acétaminophène, Métamizol, Codéine, Indométacine, Naproxen, Phénazone, Fenoprofen, Paracetamol
Agents de contraste	Diatrizoate, Iohexol, Iomeprol, Iopanidol, Iopromide, Acide Iothalamine, Acide Ioxithalamine.
Estrogènes et Hormones	17- β -estradiol, 17- α -éthynylestradiol, Diethylstilbestrol, Estrone, Diethylstilbestrol acetate
Beta-Bloquants	Metoprolol, Propranolol, Nadolol, Atenolol, Sotalol, Betaxolol
Anticancéreux	Cyclophosphamide, Ifosfamide
Diurétiques	Furosemide
Régulateurs lipidiques	Bézafibrate, acide Clofibrique, Fénofibrate, Gemfibrozil

Des efforts considérables ont été accomplis dans la mise au point de techniques d'analyse pour la détermination des produits pharmaceutiques dans des matrices complexes (y compris les eaux usées et les boues) et dans l'évaluation de leur devenir dans l'environnement (sorption, biodégradabilité). Actuellement, les techniques les plus couramment utilisées pour la détermination des produits pharmaceutiques dans l'environnement sont : GC-MS et LC-MS ou

LC - MS-MS (Nikolaou et al., 2007). Malgré ces efforts, cette tâche analytique continue à être un composant limitant lors des études sur le devenir des micropolluants dans l'environnement. La difficulté réside dans la complexité de la matrice (ex : eaux résiduaire), la grande diversité des molécules, ainsi que les faibles concentrations auxquelles ces molécules sont retrouvées.

La figure 1.1 montre les sources et les voies possibles de la présence de résidus de produits pharmaceutiques dans l'environnement aquatique. Certains de ces composés sont susceptibles de se retrouver finalement dans l'eau du robinet (Heberer, 2002).

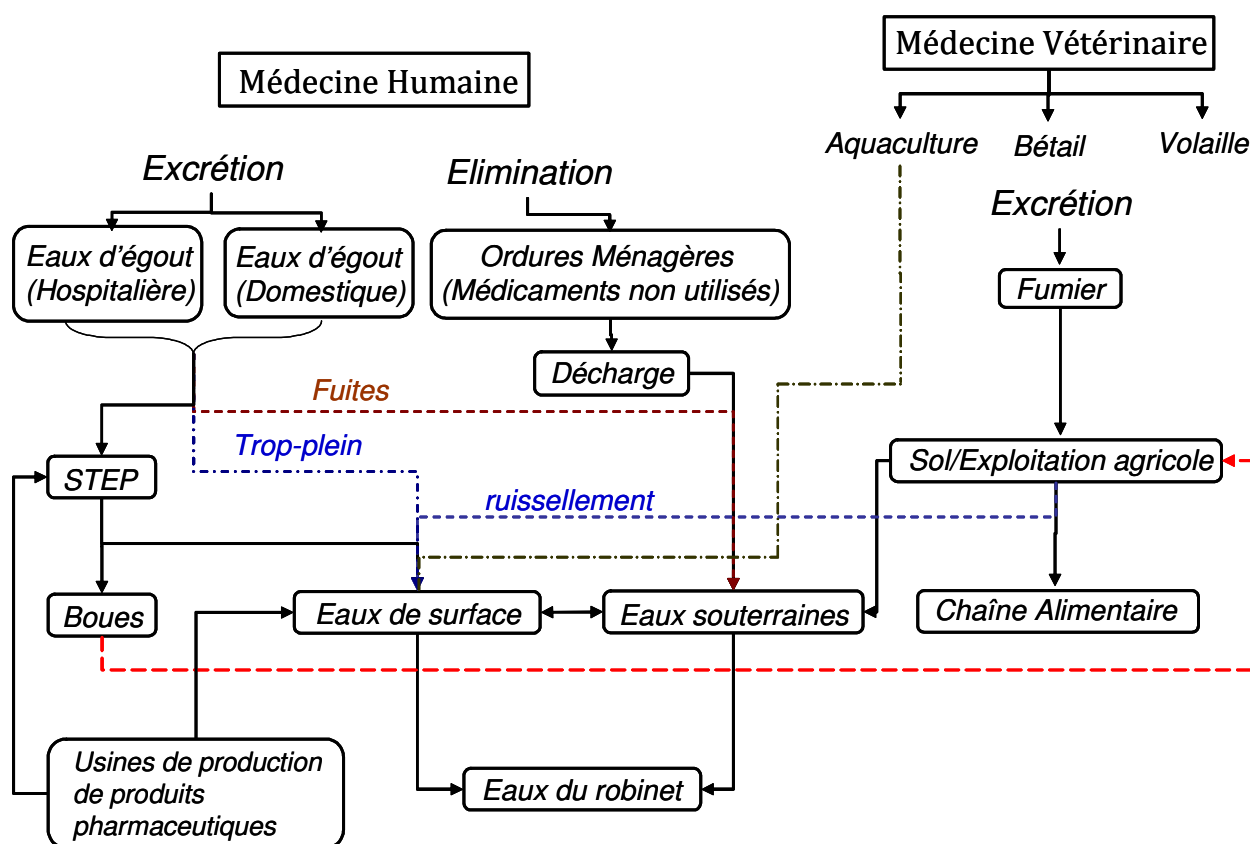


Fig. 1.1. Sources et voies possibles de la présence de résidus de produits pharmaceutiques dans l'environnement aquatique (d'après Heberer, 2002).

La plupart des molécules thérapeutiques subissent après ingestion, des transformations chimiques donnant naissance à des métabolites pouvant être plus ou moins actifs, plus ou moins toxiques. Le taux d'excrétion de médicaments partiellement métabolisés varie avec la constitution physique des patients, la posologie et le mode d'administration (Kümmerer et al., 1997). De manière générale, leur élimination est essentiellement rénale : 60% de la dose administrée en 24 heures se retrouve dans les urines sous forme de métabolites et 10% sous forme inchangée. Au total 70%

de la dose injectée ou ingérée est éliminée par les urines et les fèces (Heberer 2002), et se retrouve ainsi dans les effluents hospitaliers, voire domestiques.

Les substances pharmaceutiques et leurs métabolites peuvent également être dégradées par des processus biotiques et/ou des processus abiotiques, par exemple par hydrolyse et par photolyse (Boreen et al., 2003 ; Tixier et al., 2003 ; Lishman et al., 2006). Certains métabolites de l'ibuprofène ont déjà été détectés dans l'environnement : le hydroxy et carboxyibuprofen (Weigel et al., 2004).

La dégradation de sous-produits est également un sujet de préoccupation, car ils peuvent avoir une toxicité similaire ou supérieure à celle des composés parents (Andreozzi et al., 2003; Doll et Frimmel, 2003). Certaines études de dégradation photochimique en lumière naturelle montrent l'apparition possible de dérivés photochimiques plus toxiques que les composés parents (Della Greca et al., 2004).

Présence dans les stations d'épuration

La majeure partie des produits pharmaceutiques arrivant jusqu'aux stations d'épuration (STEP) provient des eaux résiduaires domestiques ou hospitalières ainsi que des rejets industriels (laboratoires pharmaceutiques). La présence d'une grande variété de substances actives dans l'environnement aquatique, dans les fumiers et dans les sols met en évidence que les composés pharmaceutiques ne sont pas complètement éliminés dans les stations d'épuration et dans l'environnement (Kümmerer, 2001). Effectivement, des études dont le terrain est la STEP montrent que plusieurs produits pharmaceutiques n'y sont pas complètement éliminés et sont rejetés sous forme de contaminants dans les eaux réceptrices (Joss et al., 2004; Clara et al., 2005a).

Ainsi, des études récentes ont montré la présence d'une grande variété de produits pharmaceutiques dans les effluents issus des STEP et dans des eaux de surface, avec des concentrations allant jusqu'à plusieurs $\mu\text{g} / \text{L}$ (Ternes, 1998; Jones et al., 2001; Kümmerer, 2001; Heberer, 2002; Kolpin et al., 2002 ; Giger et al., 2003 ; Fent et al., 2006 ; Moldovan, 2006 ; Nikolaou et al., 2007). Les composés les plus fréquemment détectés dans le STEP sont des antibiotiques, antiépileptiques, antiphlogistiques, produits de contraste, régulateurs de lipides, bêtabloquants et tranquillisants (Ternes and Joss, 2006). Or ces composés sont fortement

différents dans leur structure chimique et leurs propriétés physico-chimiques (Ternes et Joss, 2006).

Il faut remarquer que les concentrations détectées dans les effluents, voire dans les milieux naturels dépendent non seulement des caractéristiques et des performances de traitement des stations d'épuration, mais également des habitudes de consommation selon le pays. Par exemple, l'acide clofibrigue n'est pas détecté en France ; il s'agit du principal métabolite du clofibrate qui a été remplacé par le fénofibrate, le bézafibrate ou le gemfibrozil (Garric et Ferrari, 2005).

Halling-Sørensen et al. (1998) suggèrent trois devenir potentiels des produits pharmaceutiques et leurs métabolites dans les stations d'épuration (Halling-Sørensen et al., 1998):

1. Minéralisation complète avec la production de CO₂ et d'eau comme produits finaux de transformation.
2. Si les composés ou le produit de transformation sont lipophiles : rétention des médicaments par la phase solide (boues/bio-solides).
3. Décharge de ces composés dans les eaux réceptrices soit sous forme inchangée ou comme un produit de dégradation.

Présence dans l'eau potable

Même si les procédés de traitement sophistiqués sont largement utilisés, des produits pharmaceutiques ont été trouvés dans l'eau potable (Table 2.1.2).

Reddersen et al., (2002) ont trouvé un métabolite du médicament diméthylaminophénazone, le métabolite AMDOPH, à des concentrations autour de 0,9 µg/L dans l'eau potable de Berlin (Reddersen et al., 2002). Cela montre le caractère récalcitrant de certains produits pharmaceutiques à des procédés avancés de traitement, ainsi que leur faible taux d'élimination par des procédés moins avancés (Jones et al., 2005).

Tableau 1.2. Concentrations de composés pharmaceutiques retrouvés dans de l'eau potable (Jones et al., 2005 ; Heberer, 2002 ; Halling-Sorensen et al., 1998 ; Fent et al., 2006).

Composés	Pays	Concentration maximale retrouvée (ng/L)
Bezafibrate	Allemagne	27
Bleomycine	Angleterre	13
Acide Clofibrique	Angleterre	Identification qualitative
	Allemagne	70
	Allemagne	165
	Allemagne	270
	Allemagne	170
	Italie	5.3
Carbamazepine	Canada	24
	Etats Unis	258
Diazepam	Angleterre	10
	Italie	23.5
Diclofenac	Allemagne	6
Gemfibrozil	Canada	70
Ibuprofène	Allemagne	3
Phénazone	Allemagne	250
	Allemagne	400
Propylphénazone	Allemagne	80
	Allemagne	120
Tylosin	Italie	1.7

1.2. Risques potentiels liés à la présence de produits pharmaceutiques aux concentrations retrouvées dans l'environnement

Le risque potentiel associé à la présence de produits pharmaceutiques à des faibles concentrations dans des milieux aquatiques est actuellement au cœur des débats (Pomati et al., 2006). Dans le milieu aquatique, sauf pour les hormones stéroïdiennes, aucune étude *in situ* permettant d'évaluer objectivement le rôle de la présence des médicaments sur des perturbations d'organismes ou de communautés n'est actuellement disponible, néanmoins, il ne peut être exclu, sur la base des connaissances actuelles, qu'à long terme la présence continue de molécules pharmaceutiques dans les écosystèmes aquatiques et terrestre ne soit source de danger (Garric et Ferrari, 2005).

Les composés pharmaceutiques sont déversés de façon continue dans l'environnement et les organismes sont donc exposés à de faibles quantités sur le long terme. Bien que ces substances soient retrouvées dans l'environnement aquatiques à des concentrations très faibles bien au dessous des doses thérapeutiques utilisées (Heberer et al., 1997 ; Halling-Sørensen et al., 1998 ; Ternes, 1998 ; Hirsch et al., 1999 ; Stumpf et al., 1999; Zuccato et al., 2000), elles apparaissent néanmoins suffisantes pour pouvoir engendrer des effets adverses globaux ou spécifiques à un niveau cellulaire ou moléculaire (perturbation des mécanismes biochimiques, altération du patrimoine génétique...) (Daughton et Ternes, 1999 ; Jorgensen et Halling-Sørensen, 2000).

Toutefois, l'exposition chronique pourrait affecter une variété d'organismes non ciblés à différents stades de développement, et pour lesquels aucune action pharmacologique n'est connue. En outre, les produits pharmaceutiques sont habituellement trouvés dans des mélanges complexes de substances actives avec des entités non biologiques. Les études toxicologiques dans ce domaine, par conséquent, doivent faire face à un certain nombre de difficultés, et le risque potentiel associé à la présence des mélanges de produits pharmaceutiques polluants dans les eaux de surface est le plus souvent inconnu.

La plupart des études toxicologiques visant les organismes aquatiques ont utilisé des œstrogènes et des antibiotiques (Daughton et Ternes 1999 ; Boxall, et al., 2003 ; Pomati et al., 2004). Les tests de toxicité aiguë n'ont pas réussi à détecter les effets provoqués par l'action des produits pharmaceutiques à des concentrations retrouvées dans l'environnement. Parallèlement, certains tests ont montré que la toxicité peut être influencée par des effets additifs et/ou de synergie (Daughton et Ternes 1999 ; Pomati et al., 2004 , 2006). Ceci soulève des questions concernant la capacité de mélanges d'induire des altérations génétiques ou mutagènes (Anway et al., 2005).

Mimeault et al., (2005) ont montré que le gemfibrozil (Régulateur lipidique) s'accumule dans les poissons rouges générant des perturbations du système endocrinien. De même, les antidépresseurs, sertraline et fluoxétine, et leurs métabolites ont été retrouvés dans des poissons vivant dans des eaux recevant des eaux d'égouts (Brooks et al., 2005). Les *Daphnia* sont affectés par des faibles concentrations de la fluoxétine et de l'acide clofibrique (Flaherty et Dodson, 2005). Toutefois, d'autres études sur d'autres composés signalent de très faibles effets aux concentrations retrouvées dans l'environnement (Brooks et al., 2003; Henry et al., 2004; Nunes et al., 2005; Robinson et al., 2005).

Kümmerer (2001) suggère que le mécanisme d'action devrait être pris en compte lors des évaluations des effets de médicaments sur les organismes utilisés dans les tests standards. Certains groupes nécessitent une attention particulière :

1. Les antibiotiques et les désinfectants, étant donné leur forte toxicité bactérienne et leur potentiel à favoriser la résistance de souches bactériennes aux antibiotiques.

Les résidus d'antibiotiques dans l'environnement sont suspectés d'inciter les résistances dans les souches bactériennes causant une grave menace pour la santé publique, sachant que de plus en plus il y a des infections ne pouvant plus être traitées par un antidote connu à l'heure actuelle. Cependant, un risque potentiel pour l'environnement ne peut être encore évalué, étant donné le peu d'information qui est disponible sur le lien de causalité entre l'événement de bactéries résistantes et les antibiotiques qui se retrouvent dans l'environnement à des très faibles concentrations antibiotiques. (Hirsch et al., 1999).

2. Les hormones par leur haute efficacité et leur faible seuil d'effet.

Plus particulièrement, les hormones, naturelles ou synthétiques, sont connues pour causer des effets néfastes sur la santé dans les organismes aquatiques dès les très faibles concentrations de 0.1 -0.5 ng/L (Lange et al., 2001). De plus des travaux ont montré que les niveaux d'activité oestrogénique mesurés dans les sédiments pouvaient être jusqu'au 748 fois supérieurs à ceux mesurés dans les eaux de surface du même site, confirmant la capacité d'accumulation de ces molécules dans les sédiments (Peck et al., 2004).

3. Les métaux lourds faisant partie des désinfectants, les composés contenant du mercure, les agents cytotoxiques contenant du platine

Les métaux lourds ne sont pas biodégradables et sont hautement toxiques à certains stades d'oxydation).

4. Les chlorophénols, l'hypochlorite de sodium, d'autres désinfectants, les agents de blanchiment et les agents de contraste (Rayons X)

Ils contribuent à la présence des composés organiques halogénés adsorbables. Ces composés sont généralement non biodégradables et/ou entrent dans la chaîne alimentaire.

5. Les cytotoxiques et les médicaments immunosuppresseurs, étant donné leurs propriétés cancérogènes, mutagéniques ou embryotoxiques.

Les agents cytostatiques sont utilisés à des quantités beaucoup plus faibles que beaucoup d'autres médicaments. Du point de vue de leur impact sur l'environnement, les cytostatiques sont un groupe important du fait du risque potentiel qu'ils présentent pour les humains et pour l'environnement. Par exemple, les composés cytostatiques au platine (CPC) sont très utilisés avec succès dans la lutte contre le cancer. Toutefois, ils sont considérés comme une importante source anthropique de platine dans l'environnement. Bien que ces substances ne représentent qu'une petite fraction de platine par rapport aux émissions de convertisseurs catalytiques de voiture, ils sont beaucoup plus toxiques et cancérogènes que le platine d'origine inorganique provenant des catalyseurs (Lenz et al., 2005). En outre Webb et al. (2003) affirment que le souci potentiel avec les anticancéreux est la possibilité qu'un risque de cancer puisse exister à n'importe quel niveau d'exposition (c'est-à-dire, qu'il n'y a aucune dose seuil au-dessous de laquelle aucun effet cancérogène ne peut pas se produire).

La Communauté européenne interdit la décharge des produits chimiques et de métabolites ayant des propriétés cancérogènes ou mutagènes potentiels dans le système des eaux usées (Directive du Conseil 80/68 / EWG, 1991; directive du Conseil 76/464/EWG, 2000). Dans les eaux usées d'oncologie, des agents cytostatiques et de nombreux autres produits pharmaceutiques sont présents. Pour les hôpitaux, la réglementation actuelle n'imposant pas de règles concernant le rejet des médicaments autre que les substances radioactives, la détection et l'évaluation des résidus en sortie d'établissement ne sont généralement pas réalisées. Ce constat nous a amené à nous intéresser plus spécifiquement aux agents cytostatiques.

1.3. Les agents cytostatiques

Les anticancéreux, également connus sous les dénominations cytostatiques ou cytotoxiques, sont des médicaments qui inhibent la division cellulaire en endommageant les cellules. Pour ces composés, des propriétés cancérogènes, mutagènes, foetotoxiques et tératogènes sont souvent signalées (Johnson et al, 2008). C'est pourquoi des prescriptions draconiennes sont prises lors de

la préparation et de la mise en œuvre de ces agents. Il est par ailleurs bien connu que leur excrétion ou celle des métabolites aboutit à l'élimination de composés encore actifs (Joyeux, 2006). Cependant, les informations concernant la caractérisation des rejets de substances anticancéreuses, dans l'environnement aquatique, sont là encore très partielles.

La plupart des agents cytostatiques sont prescrits dans les hôpitaux, mais aussi, et de plus en plus, pour les traitements ambulatoires. Pour certains composés cytostatiques les plus importants (Ifosfamide et Cyclophosphamide) les quantités utilisées ont été estimées à 200 – 400 kg/année en Allemagne (Kümmerer, 2001). La demande de traitement de chimiothérapie dans les pays développés continue d'augmenter d'environ 10% par année. En outre, l'incidence du cancer progresse de plus en plus due entre autre à une plus grande proportion de personnes âgées dans la population (Johnson et al., 2008).

La majorité des médicaments anticancéreux exercent leur activité sur les cellules cancéreuses par l'intermédiaire d'une interaction directe ou indirecte sur l'ADN, par exemple, par l'alkylation de l'ADN (Johnson et al, 2008). Les plus importants sont le cyclophosphamide et l'ifosfamide utilisés dans la chimiothérapie de diverses formes de cancer (des bronches, du sein et le cancer de l'ovaire, lymphomes, leucémies, etc), dans le traitement des maladies auto-immunes (par exemple, l'arthrite rhumatoïde) et comme immunosuppresseurs après transplantation d'organes (par exemple, la transplantation de moelle osseuse) (Buerge et al., 2006).

Il a été démontré que la biodégradabilité de cytostatique est largement indépendante du mode d'action et de leur structure chimique, la plupart de substances étudiées montrent une faible biodégradabilité (Kümmerer, 2001 ; Al-Ahmad et al., 1997; Kümmerer et Al-Ahmad, 1997; Steger-Hartmann et al., 1997; Kümmerer et al., 2000; Al-Ahmad et Kümmerer, 2001). Lié à cette propriété, ces molécules sont alors suspectées de traverser les stations d'épuration et d'atteindre les eaux de surface (Kümmerer et al, 1997; Steger-Hartmann et al., 1997), dans la mesure où elles ne sont pas éliminées par le biais de l'adsorption sur la boue activée. D'ailleurs, à juger par quelques résultats, une élimination par adsorption pourrait être attendue seulement dans un nombre très petit de composés, tels que le mitoxantrone et l'épirubicine (Kümmerer, 2001). En revanche, Aherne (1990) a pu montrer que la bléomycine n'était pas dégradée au niveau des STEP et était retrouvée en sortie des installations et dans les rivières. Kümmerer et al. (1997) ont établi que l'ifosfamide n'était pas dégradé lors d'essai de Zhan-Wellens (test standardisé) ou de test de simulation de STEP et que les concentrations mesurées au niveau des effluents

hospitaliers, de l'entrée de station d'épuration urbaine et de la sortie de cette dernière étaient du même ordre de grandeur que celle estimée par un calcul théorique, indiquant un très faible niveau d'élimination de l'ifosfamide.

Des études plus récentes sur le devenir des cytostatiques 5-fluoro-uracile, doxorubicine, épirubicine, et daunorubicin dans les eaux résiduaires d'un hôpital et leur élimination par des boues activées et par un bioréacteur à membrane ont été faite par Mahnik et al. (2007). Bien qu'ils n'aient pas trouvé de différence entre les deux traitements biologiques, ils constatent que le 5-FU devrait être dégradé ou au moins métabolisé par les micro-organismes car ce composé n'est pas adsorbé par les matières en suspension dans les eaux usées. Sur des expériences de biodégradation du 5- FU en réacteurs batch avec radiomarquage, ils ont trouvé que le taux de dégradation a été directement proportionnel à la concentration initiale. Pour les anthracyclines (Doxorubicin (DOX), epirubicin (EPI), et daunorubicin (DAUN)) l'adsorption sur les solides en suspension semble être la principale voie d'élimination (Mahnik et al., 2007).

1.3.1 Le Cyclophosphamide

Le Cyclophosphamide (CP) est un des plus anciens cytostatiques connus et un des agents le plus fréquemment employé dans les thérapies anticancéreuses : traitement des cancers pulmonaires, des lymphomes, des cancers de l'enfant et cancers métastatiques, mais aussi utilisé comme immunosuppresseur lors des transplantations d'organes (Moore, 1991; Sladek, 1994). Le produit pharmaceutique est administré dans des différents schémas de traitement, d'hospitalisation ou en consultation externe (Buerge et al., 2006). Le Cyclophosphamide n'est pas complètement métabolisé dans le corps. Après l'application aux patients, l'agent est excrété par voie rénale, par laquelle jusqu'à 20% de la dose peut quitter le corps sous forme inchangé. (Gilard et al., 1994). Le taux d'excrétion rénale typique du produit sous forme inchangée est de 13% (Buerge et al., 2006). Ce composé atteint donc le milieu aquatique par les eaux résiduaires domestiques ou hospitalières et par les effluents des stations d'épuration.

Présence dans l'environnement

Le CP a été retrouvé dans les effluents hospitaliers (Steger-Hartmann et al 1996 ; 1997, Kümmerer et al 1997 ; Ternes, 1998) à des concentrations allant de 20 ng / L à 4,5 µ g/L (Steger-Hartmann et al 1996). Des études antérieures avaient montré une haute persistance de ce composé dans les station d'épuration (Steger-Hartmann et al., 1997 ; Kiffmeyer et al., 1998 ;

Kümmerer et al., 1997, Buerge et al., 2006). La présence de ce médicament a été également prouvée dans les échantillons provenant des influents et des effluents d'une station d'épuration dans laquelle l'effluent d'un hôpital est versé. Les concentrations allaient de 6 à 143 ng / l (Steger-Hartmann et al., 1997 ; Ternes, 1998).

Buerge et al., (2006) mènent une étude sur la présence du cyclophosphamide dans l'effluent d'une station d'épuration et dans des eaux de surface à Zurich, Suisse. Le CP a été détecté dans tous les échantillons d'eaux résiduaire à des concentrations entre 2 et 11 ng/L. Les concentrations déterminées dans les eaux résiduaire non traitées étaient semblables à celles présentes dans les eaux résiduaire traitées. Ces résultats s'avèrent en concordance avec l'absence de dégradation observée lors du test de biodégradation du CP par de la boue activée, conduit aussi dans cette étude. Par ailleurs, le Cyclophosphamide a été détecté dans toutes les eaux de surface étudiée : dans le lac de Zurich et dans la rivière Limmat à la sortie du lac de Zurich, les concentrations sont proches de la limite de détection (0.05-0.07 ng / L), alors que des concentrations plus élevées ont été trouvées dans la Limmat en aval de la décharge de la station d'épuration de Zurich (0,15 - 0,17 ng / L).

Dans une autre étude menée en Allemagne, le CP n'a pas pu être détecté dans les eaux de surface en raison de la sensibilité plus faible de la méthode utilisée (LOD, 10 ng / L (Ternes, 1998). Une autre étude a signalé jusqu'à 10 ng / L de CP dans un fleuve italien, mais n'a malheureusement pas donné d'informations précises sur la procédure d'analyse et le site d'échantillonnage (Zuccato et al., 2000).

Devenir dans l'environnement

La biodégradabilité de la cyclophosphamide a été précédemment examinée par d'autres groupes de recherche avec divers essais, conformément aux Test OCDE donnant des résultats négatifs pour chacun de test (Ready et inherent tests) (Steger-Hartmann et al., 1997 ; Kiffmeyer et al., 1998 ; Kümmerer et al., 1997). Ces études ont été menées pour de très hautes concentrations (jusqu'à 750 mg/L), auxquelles des effets cytotoxiques sur les micro-organismes épurateurs ne peuvent être exclues, ce qui pourrait aboutir à de faux résultats négatifs. Cependant, même à des concentrations plus faibles (90 ng/L et 900 ng/L), aucune dégradation du cyclophosphamide n'a pu être observée dans les 24 h (Buerge et al., 2006), confirmant ainsi les résultats de ces essais à très hautes concentrations mentionnées.

Di Guardo et al. (2001) jugent négligeables d'autres processus d'élimination du cyclophosphamide tels que la volatilisation ou la sorption sur la boue en raison de la faiblesse de la constante d'Henry ($6.9 \times 10^{-11} \text{ atm L / mol}$) et du faible coefficient de partage octanol-eau ($\log K_{ow} 0,97$), respectivement. (Di Guardo et al., 2001).

Risques potentiels liés à la présence du CP dans l'environnement

Par rapport à d'autres produits pharmaceutiques, CP est plutôt utilisé en faibles quantités. En conséquence, sa concentration dans les eaux de surface serait de l'ordre du pg/L seulement. Ces concentrations d'exposition sont donc plusieurs ordres de grandeur inférieurs à la concentration à laquelle les effets écotoxicologiques aigus ont été rapportés dans la littérature (Buerge et al., 2006). Dans les essais de mutagénicité avec CP sur les espèces de poissons *Astyanax bimaculatus* et *Anguilla anguilla*, les effets ont été observés à des concentrations autour du mg / L (Matsumoto et Colus, 2000 ; Santos et Pacheco, 1995).

Le potentiel de bioaccumulation est censé être faible en raison du faible coefficient de partage octanol-eau. Toutefois, des études sur les effets chroniques sur les organismes aquatiques, des essais sur la reproduction et l'immunosuppression, etc, n'ont pas été trouvés dans la littérature. En outre, aucune donnée n'a été publiée sur la présence et les effets des métabolites. Par conséquent, une évaluation finale du risque de CP et de leurs métabolites ne peut pas être faite. (Buerge et al., 2006).

Pomati et al. (2006) ont étudié les effets d'un cocktail de 13 médicaments dont le cyclophosphamide, pour simuler à la fois l'effet de synergique et leurs faibles concentrations (ng/L) détectées dans l'environnement. Le mélange était composé par de l'aténolol, du bezafibrate, de la carbamazépine, du cyclophosphamide, de la ciprofloxacine, du furosémide, de l'hydrochlorothiazide, de l'ibuprofène, de la lincomycine, de l'ofloxacine, du ranitidine, du salbutamol, et du sulfaméthoxazole. A des niveaux d'exposition retrouvés dans l'environnement, le mélange de pharmaceutiques inhibe la croissance de cellules embryonnaires humaines HEK293. Le plus grand effet observé était une diminution de 30% par rapport à la prolifération des cellules de contrôle. Les résultats suggèrent qu'un mélange de médicaments à des concentrations de l'ordre du ng/L peut inhiber la prolifération des cellules en affectant leur physiologie et leur morphologie. Cela suggère également que l'eau contenant des produits pharmaceutiques peut avoir des effets sur la vie aquatique (Pomati et al, 2006).

1.4. Généralités sur la contribution des procédés de traitement dans l'élimination de micropolluants

Même s'il s'avère impossible d'éliminer la totalité des micropolluants, certains procédés de traitement sont nettement plus efficaces que d'autres pour réduire la concentration d'un large éventail de micropolluants. Le programme **POSEIDON (Projet Européen, 2005)** a permis de confirmer que les installations classiques de boues activées sont généralement peu aptes à traiter de manière significative un certain nombre de résidus particulièrement polaires ou peu biodégradables. Cependant, pour des composés biodégradables et/ou pour des composés facilement retenus par la biomasse les procédés biologiques, tels que les boues activées ou la biofiltration, ont montré des fortes réductions de la concentration sortante (Snyder et al., 2004; Joss et al., 2005).

Concernant les procédés physico-chimiques classiques tels que la coagulation, la floculation, les processus de précipitation sont largement inefficaces pour éliminer ce type de contaminants organiques en phase dissoute (Ternes et al., 2002; Westerhoff et al., 2005). Les procédés conventionnels de traitement d'eau potable (par exemple, la coagulation et la filtration sur sable) ont été évalués par Kim et al., (2007). Ils affirment que ces procédés se sont montrés inefficaces pour l'élimination de micropolluants dans l'eau de source.

Le charbon actif peut retenir la quasi-totalité des contaminants organiques ; toutefois, la capacité d'élimination est limitée par le temps de contact, les phénomènes de compétition avec des matières organiques naturelles, la solubilité des contaminants et le type de carbone (Ternes et al., 2002; Yoon et al., 2003; Snyder et al., 2006). Les membranes d'osmose inverse (RO) et de nanofiltration (NF) sont des barrières efficaces pour la rétention de micropolluants, tandis que les membranes de microfiltration et d'ultrafiltration (UF) sont des barrières sélectives pour certains micropolluants avec des propriétés spécifiques (Snyder et al., 2006).

Les procédés d'oxydation tels que la chloration et l'ozonisation sont efficaces pour réduire les concentrations de plusieurs types de micropolluants, mais l'efficacité d'élimination est fonction de la structure du contaminant et de la dose de l'oxydant (Zwiener et Frimmel, 2000; Adams et al., 2002; Huber et al., 2003; Snyder et al., 2003; Ternes et al., 2003; Pinkston et Sedlak, 2004; Huber et al., 2005). Cependant, lors de ces études, la toxicité des produits dérivés possibles de l'oxydation n'est pas évaluée.

L'un des premiers résultats essentiels du projet POSEIDON dans la prévention de la contamination par produits pharmaceutiques des eaux réceptrices est la préconisation de l'ozonation pour traiter les eaux usées. Les auteurs affirment que l'ozonation de l'effluent peut être une mesure possible comme étape d'affinement de l'effluent après un traitement biologique des eaux usées avec la possibilité d'éliminer une grande variété de produits pharmaceutiques. L'ozonation sur effluents traités réduit considérablement les concentrations de composés pharmaceutiques à un coût acceptable à l'exception des agents de contraste iodés.

Plus en détail, les résultats liés à ce programme (POSEIDON) montrent que si l'ozone semble efficace sur des composés porteurs de groupes fonctionnels réactifs, pour ceux de faible réactivité, seules des méthodes d'oxydation avancée, associant ozone et peroxyde d'hydrogène ou ozone et UV ont quelques chances d'améliorer les rendements d'élimination. Huber et al. (2004) ont ainsi montré que l'élimination de l'ibuprofène est de l'ordre de 30% dans une filière classique et passe à près de 80% lors d'oxydation avancée. Ternes et al. (2002b) semblent obtenir des résultats satisfaisants sur la carbamazépine et le diclofénac, en revanche les rendements sont moins bons pour l'acide clofibrique. Cependant, dans ce projet, seules douze molécules sont prises en compte, on ne retrouve qu'un seul produit de contraste iodé et aucun composé antinéoplasique, ni cytotoxique.

1.5. Conclusion

Les améliorations analytiques observées ces dernières années, et spécialement les diminutions singulières des seuils de détection, permettent aujourd'hui de rendre « émergentes » des problématiques qui sont peut être anciennes. Toutefois, étant donné le nombre considérable de substances détectées, elles font apparaître de nouveaux besoins. La maîtrise de leur présence, leur transformation, et le devenir des produits pharmaceutiques dans l'environnement pose deux défis importants :

1. Le développement et l'optimisation des méthodes d'analyse pour les différents échantillons environnementaux. Environ 150 composés pharmaceutiques ont déjà été détectés dans l'environnement, principalement en milieux aqueux. La gamme de produits pharmaceutiques et de métabolites couverte par les méthodes d'analyse doit être élargie, en particulier pour les échantillons environnementaux avec des matrices plus complexes. La sensibilité des méthodes doit être optimisée afin de permettre l'analyse de ces composés.
2. Le suivi des composés pharmaceutiques lors de leur transformation dans les filières de traitement.

Les études de l'évaluation des risques environnementaux doivent être réalisées pour plusieurs composés pharmacologiquement actifs, ainsi que pour leurs métabolites, les produits de dégradation ou les produits d'apparition secondaire, et en particulier, pour des mélanges de ces composés, étant donné la présence de nombreux produits pharmaceutiques dans l'environnement en même temps.

II. Bioréacteurs à membrane et les phénomènes de colmatage

2.1 Les bioréacteurs à membrane (BàM)

Les bioréacteurs à membrane combinent dans un procédé unique l'épuration biologique et la séparation liquide/solide sur membranes poreuses. La rétention totale des micro-organismes, favorise une augmentation de la concentration des boues, et permet une séparation complète des temps de rétention hydraulique et temps de rétention des boues.

Le temps de séjour des boues (TSB ou Sludge Retention Time en anglais) ou âge de boues, est défini comme la moyenne des temps de rétention de la biomasse dans le réacteur ($V_{\text{Réacteur}}/Q_{\text{purge}}$). Le TSB est un paramètre fondamental dans le traitement des eaux usées, qui détermine la diversité biologique des boues, la quantité de bactéries prédominantes dans la biomasse active et leur activité enzymatique.

Les membranes utilisées classiquement en BàM ont des tailles de pores comprises entre 0,05 et 0,4 μm (Le-Clech et al., 2006). La force motrice est la différence de pression entre les deux côtés de la membrane. Ce procédé permet la rétention des particules en suspension, des bactéries et composés solubles en fonction de leurs tailles. La totalité de la biomasse est retenue indépendamment de ses propriétés (décantabilité, taille de floes, âge de boues). Les opérations de filtration sont conduites en imposant soit le gradient de pression, soit le flux de perméation.

Les bioréacteurs à membrane constituent une technologie prometteuse dans le secteur industriel et dans le traitement des eaux résiduaires urbaines. Le nombre d'installations pour le traitement des eaux continue à augmenter. Le marché en Europe est estimé à 57 millions d'Euros par an, avec un taux de croissance annuel de 10% (Frost et Sullivan, 2005). Atkinson (2006) estime le marché mondial actuel à environ 216 millions de dollars.

Une récente étude de marché détaillée effectuée pour la région européenne a souligné les caractéristiques suivantes (Lesjean et Huisjes, 2008) : En Europe, on comptait 154 bioréacteurs à membrane en 2002 (dont 85% pour le traitement d'eaux résiduaires industrielles). À la fin de 2005, environ 300 références d'applications industrielles ($> 20\text{m}^3 / \text{J}$) et environ 100 stations d'épuration des eaux usées municipales ($\text{STEP} > 500$ Equivalents habitants) étaient en activité. Dans les années à venir, leur développement devrait se poursuivre à raison de 70 unités par an en Europe, dont environ 50 unités industrielles et 20 unités municipales en moyenne.

On distingue deux familles selon la configuration : les bioréacteurs à boucle externe et les bioréacteurs à membranes immergées.

2.1.1 Les bioréacteurs à membrane à boucle externe (BàME)

Dans une première génération de BàM, les bioréacteurs à membrane externe, sont aussi appelés « systèmes recirculés », puisque la liqueur mixte est pompée du bassin aéré vers le module de filtration placé à l'extérieur du bioréacteur (figure 2.1.1.1). Le retentat qui contient les molécules ou particules retenues est renvoyé vers le bassin d'aération.

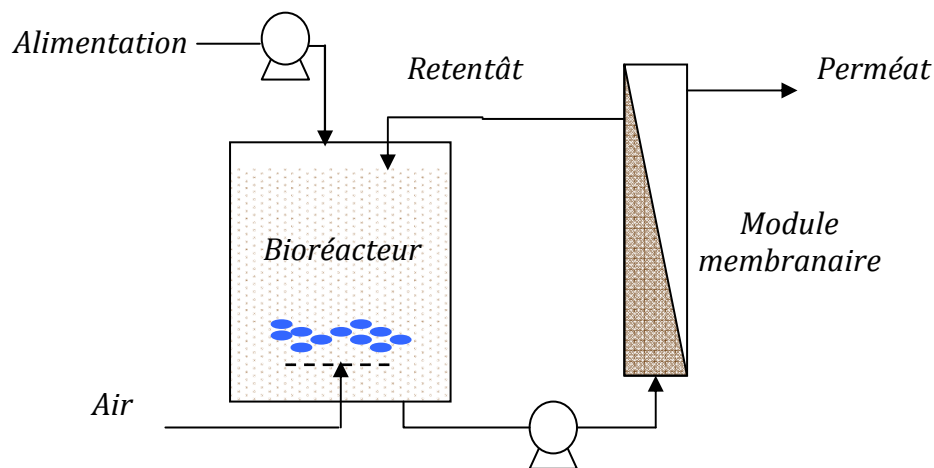


Figure 2.1.1.1 Schéma d'un Bioréacteur à membrane Externe

La filtration, interne/externe, mise en œuvre est de type tangential. La vitesse de circulation doit être élevée (2 à 5 m/s) afin de générer des contraintes de cisaillement, qui vont limiter le développement du colmatage par dépôt, pour conduire à des valeurs élevées de flux de filtrat. Les modules tubulaires ou les plans sont les plus souvent utilisés. Les flux obtenus sont de l'ordre de 50 à 120 $\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$. (Xing et al., 2000). Leurs inconvénients sont essentiellement le taux de

cisaillement important subi par la biomasse (Wisniewski et al., 2000 ; Kim et al., 2001) ainsi que la consommation énergétique relativement élevée (de l'ordre de 10 à 50 kWh.m⁻³, Gander et al., 2000 ; Le-Clech et al., 2006).

2.1.2 Les bioréacteurs à membranes immergées (BàMI)

Dans la seconde génération, le module de membrane est immergé dans le bassin d'aération (figure 2.1.2.1). Le perméat est soutiré par aspiration ce qui évite de pressuriser le bioréacteur. Ainsi la pression transmembranaire sera inférieure à 1 bar, en conséquence la dépense énergétique associée au BàMI est de l'ordre de 0,2-0,4 kWh.m⁻³ (Gander et al., 2000).

Les modules utilisés sont généralement des fibres creuses (la filtration a lieu de l'extérieur de la membrane vers l'intérieur des fibres) ou des membranes planes. La filtration mise en œuvre dans les BàMI peut être dite de type frontal car la vitesse du liquide est faible au voisinage de la membrane.

Les flux typiques pour des fonctionnements à long terme se situent entre 5 – 20 L.h⁻¹.m⁻². (Chang et al., 2002). Une aération par des grosses bulles est employée comme moyen mécanique pour prévenir, limiter et contrôler les dépôts et le colmatage. L'air est introduit au-dessous de la membrane et distribué de façon homogène pour optimiser l'action d'érosion de l'air à la surface de membrane.

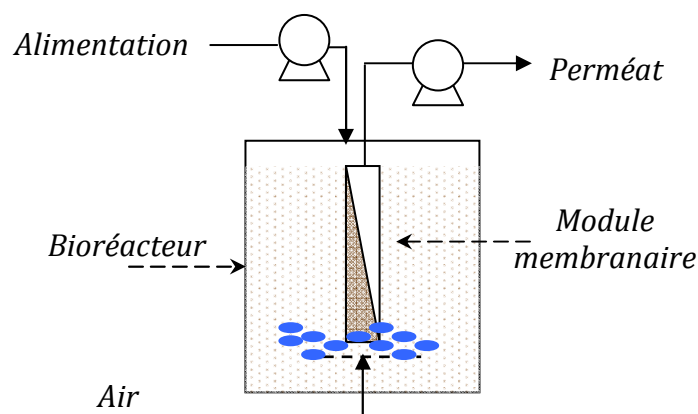


Figure 2.1.2.1 Schéma d'un Bioréacteur à membranes immergées

Un nouveau bioréacteur (Figure 2.1.2.2), classé dans la catégorie des configurations internes, a récemment été développé. Il résulte d'un compromis entre les BàM à boucle externe et les BàMI. Les membranes sont immergées dans un carter placé à l'extérieur du bioréacteur, facilitant les

opérations de maintenance (inspections, l'entretien nettoyage chimique). La filtration est semi-frontale, avec une très légère vitesse de circulation créée par un recyclage de la biomasse à faible débit. Les membranes utilisées sont généralement des fibres creuses. Dans cette configuration l'aération, nécessaire au métabolisme de la biomasse et à l'agitation des fibres, est découplée et ainsi optimisée. La séparation de l'unité de filtration du bioréacteur pourrait être bénéfique en cas d'une élimination avancée des éléments nutritifs (Lesjean et al., 2002).

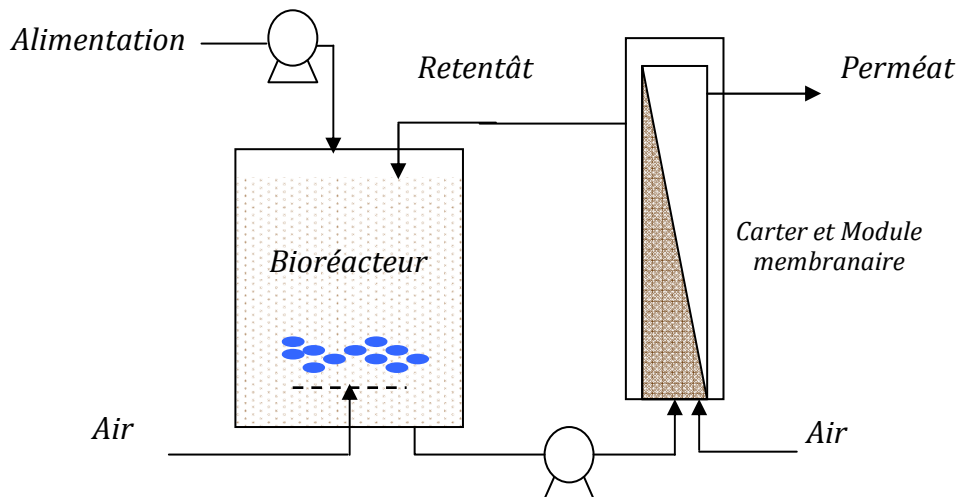


Figure 2.1.2.2 Schéma d'un Bioréacteur à membrane à filtration semi-frontale avec module externe

2.2 Le colmatage dans les bioréacteurs à membrane

Le colmatage d'une membrane peut être défini comme l'ensemble des phénomènes qui interviennent dans la modification de ses propriétés filtrantes. Le colmatage se traduit par une diminution du flux de perméat pour une filtration à pression constante, ou une augmentation de la pression transmembranaire lors d'une filtration à flux de perméat constant. Il s'agit de phénomènes physiques, chimiques et biologiques se produisant à l'interface membrane/milieu biologique. Il peut être de nature inorganique (dépôt de particules, de CaCO_3 , de précipité de sels,...) et/ou organique (Biofilm, EPS,...) (Judd 2004, Ognier et al., 2002). Les mécanismes de colmatage dans un procédé BâM sont très complexes de ce fait la prévision du colmatage reste encore difficile.

Le milieu présent dans les bioréacteurs à membrane est communément appelé boue activée ou liqueur mixte. Cette liqueur mixte est un milieu non homogène composé des diverses populations

de bactéries, des matières en suspension, des macromolécules, des ions pouvant former des complexes avec les molécules organiques, des petites molécules organiques ou minérales. Chaque élément peut contribuer au colmatage des membranes. Particulièrement, la partie liquide ou surnageant de la liqueur mixte (composée de colloïdes et de substances dissoutes) participent amplement au colmatage. Les substances dissoutes proviennent à la fois de l'effluent à traiter mais aussi du métabolisme bactérien. On y trouve notamment des polymères extracellulaires (sucres, protéines, acides humiques...) qui sont reconnus comme des substances à haut pouvoir colmatant (Le-Clech et al., 2006).

On distingue communément deux grands types de colmatage. Le premier correspond à un colmatage dit **réversible** pouvant être éliminé *in situ* par différents moyens mécaniques tels que l'application de grosses bulles d'air, ou par rétrolavage à l'eau (filtration sous pression de perméat en sens inverse de la filtration, pour les BâMI), ou l'augmentation de la vitesse tangentielle le long de la membrane (pour les BâME) alors que, le colmatage **irréversible** nécessite obligatoirement un lavage chimique de la membrane (Jiang et al., 2003).

Hermia (1982) a proposé une classification plus précise des types de colmatage basée sur la comparaison entre la taille des pores de la membrane et celle des particules. Cette classification reste aujourd'hui très utilisée (Figure 2.2.1).

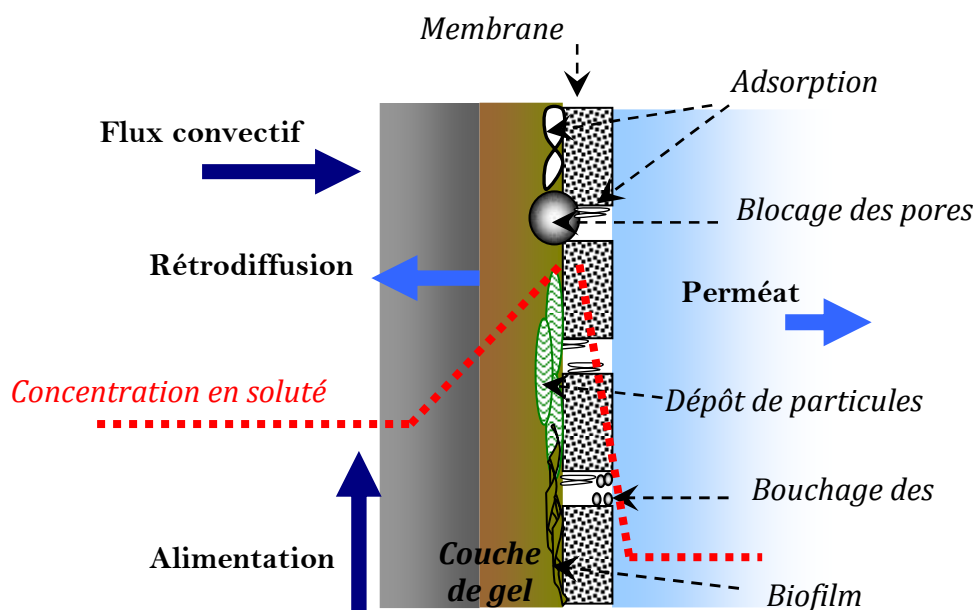


Figure 2.2.1. Schéma des différents mécanismes de colmatage.

- Si la taille des particules est supérieure à celle des pores un colmatage en surface dit colmatage par gâteau se produit (dépôt en surface de la membrane).
- Si la taille des particules est largement inférieure à celle des pores, les particules vont entrer à l'intérieur de la membrane réduisant progressivement la taille des pores jusqu'à les boucher totalement. C'est ce qu'Hermia appelle le bouchage de pore. Il s'en suit une réduction de la surface poreuse de la membrane.
- Si la taille des particules est similaire à celle des pores un phénomène de blocage de pore se produit. Ce phénomène de blocage conduit à une diminution de la surface filtrante de la membrane.

On peut également associer à ces différents types de colmatage des phénomènes de maintien de la matière à la membrane : adsorption et polarisation de concentration. Ces deux derniers phénomènes ne font pas directement intervenir la taille des floes mais plutôt les interactions entre la suspension et la membrane.

- L'adsorption est un phénomène irréversible dû aux interactions physico-chimiques (ponts hydrogène, liaison de type Van der Waals et électrostatiques) entre les solutés et la surface de la membrane. Elle correspond à la formation d'une ou de plusieurs couches moléculaires à la surface ou à l'intérieur des pores de la membrane ou au niveau du gâteau de filtration. Il y a alors un changement de densité et de taille des pores de la membrane. L'adsorption ne peut pas être éliminée par des méthodes physiques et nécessite alors un lavage chimique adapté.
- La polarisation de concentration décrit la tendance du soluté à s'accumuler dans le voisinage de la surface de la membrane. L'accumulation progressive des espèces par convection (molécules ou particules) établit un gradient de concentration entre la paroi de la membrane et la solution. Cette différence de concentration entraîne un flux de diffusion de la membrane vers la solution (flux rétrodiffusif). Ce phénomène peut conduire à la formation d'une couche de gel et à la précipitation des solutés. La couche ainsi formée constitue une deuxième barrière filtrante pouvant retenir des particules de dimensions inférieures au seuil de coupure de la membrane.

L'épaisseur de la couche est limitée quand la turbulence est favorisée (Aimar et Sanchez, 1989). Dans le cas des bioréacteurs à membrane externe, l'augmentation de la vitesse d'écoulement du

liquide aux abords de la membrane réduit l'épaisseur de la couche de polarisation, favorisant le flux du filtrat (Lübbecke et al., 1995).

Dans le cas spécifique de la filtration d'une eau résiduaire, un dépôt de type biologique est observé. Il est issu de la colonisation par les micro-organismes de la surface de la membrane et provoque la formation d'un biofilm. Les micro-organismes du biofilm sécrètent des exopolymères qui tendent à structurer le dépôt et facilitent son adhésion au matériau membranaire. Jinhua et al. (2004) mettent en évidence la présence de l'espèce *Xanthomonas* au sein du biofilm et observent une production de gomme de Xanthan (polysaccharide à haute masse moléculaire) responsable de la cohésion et de la structuration du biofilm.

Les mécanismes les plus cités dans la littérature sont le colmatage par gâteau (notamment pour les BâMI) et le colmatage interne avec mise en évidence de phénomène d'adsorption ou de bouchage de pores, toutefois souvent le colmatage ne peut être réduit à un seul type. En effet, le colmatage dans sa globalité est souvent une succession des mécanismes présentés ci-dessus.

Pour expliciter le colmatage, la loi de Darcy associée au modèle de résistances en série est largement utilisée. En l'absence de colmatage, pour la filtration d'un solvant pur (eau), le flux de perméat J peut être représenté par la loi de Darcy:

$$J = \frac{\Delta P}{\mu \cdot R_m}$$

Avec,

J	densité de flux ($\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).
ΔP	pression transmembranaire (Pa).
μ	viscosité dynamique du perméat (Pa.s).
R_m	résistance hydraulique de la membrane (m^{-1}).

Lorsque la membrane se colmate, une résistance supplémentaire R_c s'ajoute à la résistance de la membrane R_m (modèle des résistances en série). La loi de Darcy s'écrit alors :

$$J = \frac{\Delta P}{\mu \cdot (R_m + R_c)}$$

Le terme R_c inclut les résistances dues à l'adsorption R_a , au dépôt réversible ou irréversible R_d , à la couche limite de polarisation R_{pol} .

$$R_c = R_a + R_d + R_{pol}$$

Cette formulation mathématique est relativement simple. Elle permet de rendre bien compte du phénomène de colmatage se produisant sur les membranes des BAM (Van Kaam, 2005).

III. Elimination de micropolluants : sorption - Biodégradation

3.1 Adsorption de micropolluants

3.1.1 L'adsorption- Concepts généraux

L'adsorption est le processus au cours duquel des molécules d'un fluide (gaz ou liquide), appelé « adsorbat », viennent se fixer sur la surface d'un solide, appelé « adsorbant ». Par la surface du solide, on sous-entend les surfaces externes et internes engendrées par le réseau de pores et cavités à l'intérieur de l'adsorbant. Il existe deux types de processus d'adsorption, l'adsorption physique ou physi-adsorption et l'adsorption chimique ou chimie-sorption.

Dans le cas de l'adsorption physique, la fixation des molécules d'adsorbat sur la surface d'adsorbant se fait essentiellement par les forces de Van der Waals et les forces dues aux interactions électrostatiques de polarisation, dipôle et quadripôle pour les adsorbants ayant une structure ionique. L'adsorption physique se produit sans modification de la structure moléculaire et est parfaitement réversible. Dans le cas de l'adsorption chimique, le processus résulte d'une réaction chimique avec formation de liens chimiques entre les molécules d'adsorbat et la surface d'adsorbant.

3.1.2 La Bio-adsorption

La bio-adsorption peut être définie comme un mécanisme physico-chimique, incluant des phénomènes d'adsorption, de complexation de surface, d'échange d'ions, avec une biomasse morte ou vivante aussi bien qu'avec des composés externes (exo-polymères par exemple). On

peut considérer la bio-sorption comme la première étape de l'interaction biomoléculaire substance-microorganisme. Ces mécanismes interviennent sur la paroi cellulaire, la cinétique étant relativement rapide. La bio-sorption est généralement étudiée lors du traitement de métaux lourds présents dans les eaux usées.

3.1.3 Le coefficient d'adsorption

Une valeur caractéristique souvent utilisée pour l'évaluation de l'adsorption est le coefficient d'adsorption spécifique K_D (L/ kg MES). Ce coefficient de partage est défini comme le rapport des concentrations d'équilibre d'une substance dissoute dans un système à deux phases constituées d'un adsorbant et d'une phase aqueuse :

$$K_D = \frac{qe_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} \cdot 1000 \quad \text{eq 1.1}$$

Où $qe_s^{ads}(eq)$ est la quantité de substance adsorbée sur la boue à l'équilibre d'adsorption (mg/g MES), $C_{aq}^{ads}(eq)$ est la concentration en masse de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption (mg/L).

D'autres paramètres caractéristiques utilisés pour décrire la capacité d'adsorption d'un agent adsorbant sont les valeurs K_{OM} et la K_{OC} . Le K_{OM} (L/kg MVS) est le rapport de la valeur K_D à la matière organique de l'adsorbant (Eq. 2), alors que la valeur K_{OC} (L/kg Carbone organique) se rapporte au carbone organique contenu (F_{OC}) dans le matériau absorbant, tel que décrit dans l'équation 3.

$$K_{OM} = K_D \frac{MES}{MVS} \quad \text{eq 1.2}$$

MES, est la concentration de la matière totale en suspension (g/L), et VSS, est la concentration de la matière volatile en suspension (g/L).

$$K_{OC} = K_D \frac{100}{\%CO} \quad \text{eq 1.3}$$

Où %CO, est le pourcentage de carbone organique dans l'échantillon de boue (g/g).

3.1.4 Capacités d'adsorption

Lorsque l'on met en contact une phase liquide contenant un soluté et un solide adsorbant, le soluté va s'adsorber dans le volume poreux du solide et au bout d'un certain temps, il s'établit un équilibre entre deux phases. Si on connaît la concentration en soluté dans la phase liquide au début (C_o) et lorsque l'on est à l'équilibre (C_e), la masse d'adsorbant (m) et le volume de liquide dans le flacon (V), on peut en déduire par bilan la quantité adsorbée (qe) exprimée en gramme de soluté par gramme de solide :

$$qe = \frac{(C_o - C_e).V}{m_{adsorbant}} \text{ eq 1.4}$$

Il existe diverses expressions pour décrire les isothermes d'équilibre, la plus utilisée pour relier les données expérimentales d'adsorption des micropolluants est une relation empirique, appelée isotherme de Freundlich. Le modèle Freundlich a été largement adopté pour caractériser l'adsorption des polluants organiques dans l'eau (Jianlong et al., 2000 ; Clara et al., 2004). L'équation de Freundlich est utilisée pour les énergies de surface hétérogène (comme c'est le cas des flocs microbiens) :

$$qe = k_f . C_e^{1/n} \text{ e.q 1.5}$$

Où k_f et $1/n$ sont des constantes dépendant du couple soluté-adsorbant et de la température. Quand $1/n < 1$, l'adsorption est favorable. Au contraire, $1/n > 1$ montre une adsorption défavorable. Les coefficients k_f et $1/n$ donnent des mesures approximatives de la capacité d'adsorber et de l'intensité de l'adsorption, respectivement. Cette relation pourrait être expliquée par une distribution exponentielle des énergies d'adsorption. Cependant, la forme de l'équation 1.5 suggère qu'il n'existe pas de limite pour qe lorsque C_e augmente, ce qui est impossible physiquement. Ceci veut dire que l'équation de Freundlich est utilisable pour des valeurs faibles de C_e .

Le logarithme de chaque membre de l'équation 1.5 donne : $\ln(qe) = \ln(k_f) + 1/n * \ln(C_e)$. Avec la droite $\ln(qe)$ Vs $\ln(C_e)$, on obtient une pente égale à $1/n$ et une ordonnée à l'origine égale à $\ln(k_f)$.

Dans le cas d'une isotherme linéaire ($1/n = 1$), le coefficient d'adsorption de Freundlich k_F correspond à la valeur K_D . (Cf équation 1.1)

3.1.5 L'adsorption des composés pharmaceutiques dans les stations d'épuration

L'adsorption peut être un des principaux facteurs influençant l'élimination des polluants organiques dans les stations d'épuration. Elle pourrait également influencer le rendement d'autres processus tel que la biodégradation (Bekbolet et al., 1999). En conséquence, les propriétés d'adsorption des produits pharmaceutiques sont cruciales pour la compréhension de leur sort et de leur l'impact dans l'environnement (Carballa et al., 2007).

L'adsorption dépend des caractéristiques physico-chimiques du solides et des produits chimiques concernés (Bowman et al., 2002; Holthaus et al., 2002), ainsi que des conditions ambiantes telles que le pH, force ionique, la température ou la présence d'agents complexant (Spark et Swift, 2002).

La sorption des composés hautement hydrophobes comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)), les polychlorobiphényles (PCB) et les insecticides a été largement étudiée au cours des dernières décennies (Poerschman et Kopinke, 2001; During et al., 2002; Stevens et al., 2003). Toutefois, la base de données sur la sorption modérée de substances polaires telles que les produits pharmaceutiques est beaucoup plus modeste. L'évolution récente des méthodes d'analyse pour mesurer les produits pharmaceutiques contenus dans les boues a permis la détermination des quantités adsorbées sur la biomasse. Des valeurs de K_{oc} et de K_D pour certains produits pharmaceutiques dans les boues primaires et secondaires ont été récemment rapportées (Stuer-Lauridsen et al., 2000; Jones et al., 2002; Simonich et al., 2002; Artola-Garicano et al. , 2003; Golet et al., 2003; Clara et al., 2004; Holbrook et al., 2004; Ternes et al., 2004; Andersen et al., 2005; Urase et Kikuta, 2005).

Plusieurs approches ont été utilisées pour déterminer l'affinité d'une substance donnée aux solides, elles sont fondées sur le coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}) et sur le coefficient K_{oc} des différents composés. Les deux hypothèses sont raisonnables pour les interactions lipophiles non-spécifiques. Néanmoins, en ce qui concerne les produits pharmaceutiques, des récentes études ont révélé des écarts importants entre les coefficients disponibles K_{ow} et les coefficients K_{oc} . Cela pourrait s'expliquer par le fait que les produits pharmaceutiques contiennent souvent des groupes fonctionnels polaires (par exemple des fractions carboxyliques, des aldéhydes et des amines), pouvant seulement interagir avec des parties de la matière organique ou avec des minéraux, et donc les valeurs de K_{ow} et K_{oc} ne sont pas adéquates pour simuler leurs propriétés de

sorption sur les boues (Goss et Schwarzenbach, 2001; Golet et al., 2003; Ternes et al., 2004). Par exemple, les interactions électrostatiques spécifiques sont connues pour être pertinentes pour des produits pharmaceutiques tel que le fluoroquinolone qui a un coefficients K_D élevé, bien que leur coefficient K_{OW} soit extrêmement faible (par exemple, la norfloxacin: $\log K_{OW} = 1$; $\log K_D$ (boues) = 3.9) (Golet et al., 2003).

La sorption dans les stations d'épuration peut être raisonnablement estimée à l'aide du coefficient K_D (Schwarzenbach, 2003).

Ternes et al. (2004) ont évalué les coefficients K_D pour différents composés pharmaceutiques sur des boues primaires et secondaires d'une station d'épuration municipale. Les valeurs sont résumées dans le tableau 3.1.5.1. Les différences entre la « sorption » sur les boues primaires et les boues secondaires sont susceptibles de dépendre de deux mécanismes principaux :

- **L'absorption:** interactions hydrophobes des aliphatiques et aromatiques d'un composé lipophile avec la membrane cellulaire des micro-organismes et les fractions lipidiques des boues.
- **L'adsorption:** interactions électrostatiques de charge positive des groupes de produits chimiques avec la charge négative des surfaces des micro-organismes.

Ternes et al., (2004) signalent que la plupart des produits pharmaceutiques montrent des faibles valeurs du coefficient K_D , en indiquant que la sorption est négligeable et suggérant que l'élimination observée pour certains composés pharmaceutiques dans les stations d'épuration est principalement le résultat de la biodégradation. Etant donné que les valeurs K_D de certains produits pharmaceutiques étaient différentes pour les boues primaires et pour les boues secondaires, la composition et le pH des boues semble être crucial, au moins pour les interactions spécifiques de sorption. Dans les boues secondaires, les micro-organismes représentent la plus grande proportion des solides en suspension, tandis que les boues primaires essentiellement contiennent moins de micro-organismes et disposent d'une grande fraction de lipides.

Tableau 3.1.5.1. Coefficients de sorption pour des boues d'une station d'épuration municipale, mesurés en expériences Batch et le coefficient de distribution Octanol-eau (Ternes et al., 2004).

Utilisation	Composé	Boues Primaires K_D (L/Kg)	Boues secondaires K_D (L/Kg)	Log K_{ow}
Composés pharmaceutiques acides	Diclofénac	459±32	16.0 ± 3.1	4.6
	Ibuprofène	--(<20)	7.1 ± 2.0	3.5
	Acide Clofibrique	--(<30)	4.8 ± 2.5	2.57
Composés pharmaceutiques neutres	Ifosfamide	21.8±13.8	1.4 ± 0.4	0.86
	Cyclophosphamide	55.4 ± 19.6	2.4 ± 0.5	0.63
	Carbamazine	--(<20)	1.2 ± 0.5	2.45
	Diazepam	43.9 ± 26.1	21.1 ± 7.6	2.82
Fragrances	Galaxolide (HHCB)	4919±2073	1807± 534	5.9
	Tonalide (AHTN)	5299 ± 1905	2372 ± 958	5.7
Estrogènes agents de contraste iodés	17 α Ethinylestradiol	278±3	349 ± 37	3.9
	iopromide	--(<5)	11 ± 1	-2. 33

Théoriquement, la sorption des substances sur la boue avec des valeurs de log K_D inférieures à 2, est négligeable, alors que, la sorption des substances sur la boue avec des valeurs de log K_D supérieures à 4, est l'un des principaux processus d'élimination (Clara et al., 2004).

Joss et al., (2005) affirment que pour des composés dont le coefficient d'adsorption (K_D) est inférieur à 300 L/Kg (cyclophosphamide : K_D < 55 L/Kg, Ternes et al., 2004), l'adsorption sur la biomasse n'est pas significative et la transformation peut être évaluée simplement en comparant les concentrations en entrée et en sortie du procédé.

Les chercheurs participant au projet POSEIDON affirment que la sorption peut être négligée pour des composés avec un $K_D \leq 500$ L/kg. Cependant, au cours de la stabilisation des boues, les substances avec des valeurs inférieures doivent être également prise en compte, car la quantité adsorbée n'est pas seulement tributaire de la valeur K_D , mais également des concentrations en boues. Dans ce cas, la limite de pertinence est d'environ $K_D < 1$ L/kg.

Très peu d'études parlent de l'adsorption des cytostatiques sur des boues activées. Parmi les composés présentés sur le tableau 3.1.5.1 (Ternes et al., 2004), on trouve deux agents

cytostatiques, le cyclophosphamide et l'Ifosfamide. Ces composés montrent des valeurs très différentes du coefficient K_D dans la boue primaire et la boue secondaire. Néanmoins, même pour les valeurs les plus élevées dans les boues primaires, la sorption peut être négligée, car la plus grande partie de la sorption ne dépasse pas 2%. La différence entre les valeurs K_D pour les boues primaires et les boues secondaires pourrait être causée par des interactions non ioniques. Toutefois, le mécanisme de sorption n'est actuellement pas connu.

Une autre étude préliminaire travaillant sur des composés cancerostatique de platine (le cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine) a indiqué que le mécanisme le plus probable d'élimination de ces composés de la phase liquide est l'adsorption sur les boues activées pendant le traitement des eaux usées (Lenz et al., 2005).

Deux ans plus tard, Lenz et al., (2007) rapportent leur travail sur le sort de deux composés cancerostatique de platine (CPC), le cisplatine et le carboplatine, ainsi que de deux composés inorganiques de platine, $[PtCl_4]^{-2}$ et $[PtCl_6]^{-2}$ dans le traitement biologique des eaux usées. L'adsorption diminué selon l'ordre suivant : cisplatine > $[PtCl_6]^{-2}$ > $[PtCl_4]^{-2}$ > carboplatine. Les valeurs $\text{Log}K_D$ allant de 2,5 à 4,3, et les valeurs de $\text{log } K_{OC}$, passant de 3,0 à 4,7. Ils observent que la saturation n'a été atteinte dans aucun cas, pour aucune substance, ce qui montre l'excellent potentiel d'adsorption des boues activées pour ces composés.

Des composés non ioniques, comme les fragrances polycycliques ou le 17 α -ethinyloestradiol (EE2) ont tendance à être absorbés dans la fraction lipidique ou adsorbés sur la matière organique (interactions non-ionique de Van der Waals) à des valeurs de pH ambiant (Clara et al., 2004). Du fait de leurs propriétés d'adsorption les œstrogènes stéroïdiens peuvent être efficacement éliminés à plus de 80% lors du traitement en station d'épuration par boues activées (par ordre décroissant 17- β -oestradiol, 16- α -hydroxyoestrone, EE2, oestrone, Ternes et al., 1998).

Pour les composés contenant des groupes fonctionnels qui peuvent être ionisés et non ionisés, le pH de la liqueur mixte pourrait jouer un rôle crucial (Ternes et al., 2004). Les floccs et les substances polymériques extracellulaire (EPS) sont, en règle générale, chargés négativement. Par rapport à l'influence des conditions opératoires sur la charge de floccs, Lee et al. (2003) constatent que la charge de surface d'un flocc augmente lorsque l'âge de boue diminue.

La concentration en ion hydrogène (pH) affecte principalement le degré d'ionisation du composé et les propriétés superficielles de la biomasse. Ceux-ci peuvent à son tour mener à un changement dans la capacité d'adsorption à l'équilibre. Une diminution du pH résulte éventuellement d'une réduction des charges négatives à la surface de la biomasse (le point isoélectrique de boues activées sera généralement entre pH = 1 et pH = 3). Il est communément observé que les anions sont favorablement adsorbés sur la surface d'adsorbant à pH bas. En général, le taux d'adsorption de polluants organiques de la solution aqueuse augmente avec la diminution du pH (Jianlong et al., 2000).

Les substances polymériques extracellulaires (EPS) contiennent de grandes quantités de groupes fonctionnels négativement chargés et ont de fortes capacités d'adsorber des métaux lourds et des polluants organiques. Comme il y a un grand nombre de groupes fonctionnels négativement chargés sur la surface d'EPS à pH neutre ou à pH alcalin, les EPS pourraient former des liaisons avec des substances cationiques grâce à des interactions électrostatiques (Sheng, et al., 2007).

3.2 Biodégradation de micropolluants

3.2.1 Estimation de la biodégradabilité de micropolluants

Joss et al., 2006, suggèrent un schéma simple de classification afin de caractériser la dégradation biologique des micropolluants tels que des composés pharmaceutiques, des fragrances et de perturbateurs endocriniens pendant le traitement des eaux résiduaires. Dans des bioréacteurs en batch, lors de l'élimination de micropolluants, une diminution exponentielle dans le temps de la concentration peut être observée pour tous les composés transformés. Si l'on suppose une élimination de pseudo premier ordre :

$$\frac{dC}{dt} = k_{biol} \cdot X_{ss} \cdot S$$

Où, C est la concentration totale du composé ($\mu\text{g/L}$) ; S la concentration soluble du composé ($\mu\text{g/L}$), t le temps (jours), k_{biol} la constante de la vitesse de réaction (L/g/J) et X_{ss} la concentration en solides en suspension (g/L).

Etant donné que la constante de vitesse réaction k_{biol} est exprimée par la concentration des solides en suspension, il ne dépend pas seulement de la biodégradabilité de chaque composé spécifique, mais aussi de la composition des boues.

Les expériences en Réacteurs Batch ont été réalisées avec des boues d'une station d'épuration classique des boues activées (BA) et d'un bioréacteur à membranes (BàM), tous deux alimentés avec les mêmes eaux usées municipales. Pour tous les composés d'essai, les réacteurs ont été « arrosés » avec le composé à étudier à une concentration de 3 µg/L.

La Fig. 3.2.1.1 donne une vue de l'ensemble des constantes cinétiques de dégradation de 35 produits pharmaceutiques, de certaines hormones et quelques produits cosmétiques par des boues activées selon Joss et al. (2006). Trois groupes de micropolluants peuvent être identifiés selon leur constante de biodégradation k_{biol} :

1. Composés avec $k_{biol} < 0,1$ L/g/j ne sont pas éliminés en quantités significatives (<20%)
2. Composés avec $k_{biol} > 10$ L/g/j sont transformés à plus de 90%,
3. Composés entre $10 \text{ L/g/J} > k_{biol} > 0,1 \text{ L/g/j}$ une transformation modérée est attendue.

Selon ces données, seulement quatre composés (ibuprofène, paracétamol, 17β-œstradiol et l'estrone) sur 35 devraient être biologiquement transformés à plus de 90% ($k_{biol} > 10$ L/gSS/J). Seize composés sont censés être partiellement éliminés ($0,1 > k_{biol} > 10$), tandis qu'aucune transformation biologique remarquable n'est prévue pour 17 composés ($k_{biol} < 1$, entre autres, la plupart des macrolides et des antibiotiques sulfonamide).

Les résultats de la Fig. 3.2.1.1 sont généralement en bon accord avec les données trouvées dans la littérature (Beausse, 2004; Buser et al., 1999; Heberer, 2002; Ternes, 1998). Cependant, certaines études diffèrent considérablement (diclofénac et l'indométhacine dans Ternes, 1998, fénoprofène, l'ibuprofène, l'indométhacine, le gemfibrozil et oestrogènes dans Urase et Kikuta, 2005): au moins une partie de la différence pourrait être expliquée par (i) une concentration expérimentale sensiblement plus élevée des composés pharmaceutiques, (ii) l'origine des boues (âges différents, composition des eaux usées) ou (iii) le traitement des boues avant l'expérience (par exemple sur le dosage du substrat artificiel, le stockage des boues).

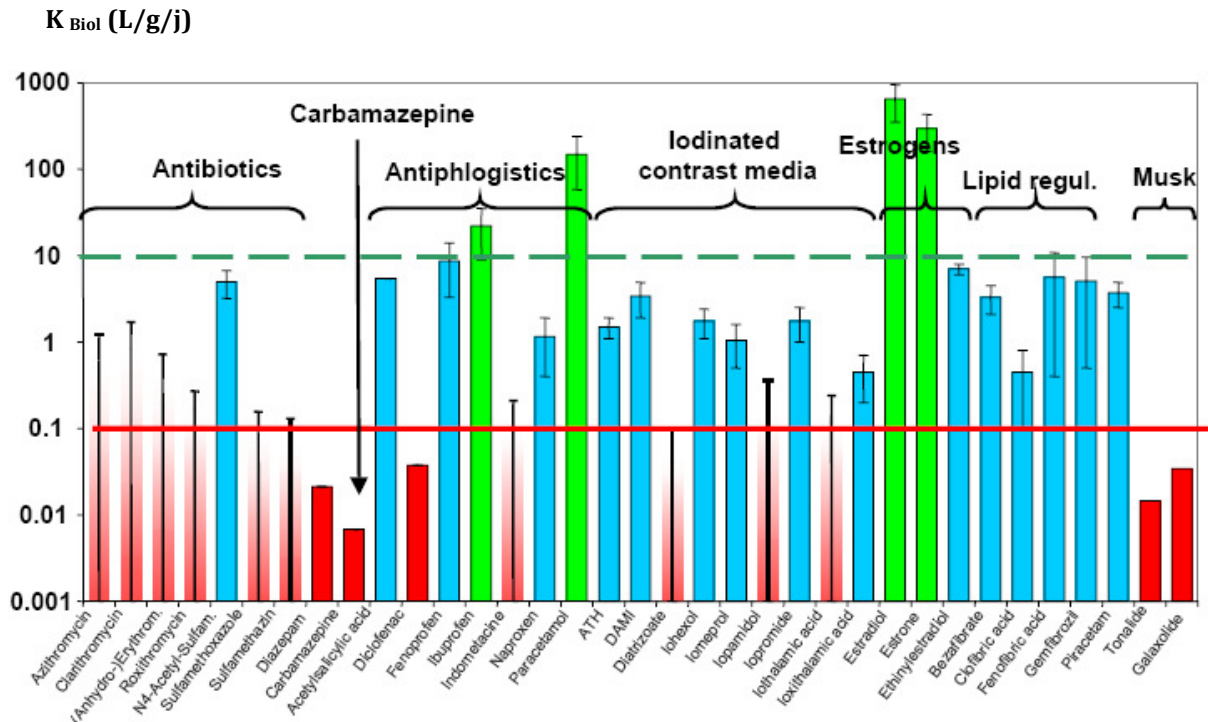


Figure 3.2.1.1. Constantes de cinétiques de dégradation de 35 produits pharmaceutiques, hormones et produits cosmétiques observés pour les boues d'une station d'épuration municipale avec des âges de boues ≥ 8 jours: la moyenne des expériences en Batch des boues provenant de boues activées et d'un Bioréacteur à membrane est indiqué. Les barres d'erreur indiquent l'intervalle de confiance 95%. Les lignes à k_{biol} 0,1 et 10 L/g/j indiquent les limites pour moins de 20% et plus de 90% d'élimination prévue pour des stations d'épuration capables d'éliminer de l'azote et du phosphore des eaux usées municipales. Les colonnes en couleur dégradée indiquent des valeurs pour lesquelles la résolution expérimentale limitée permet seulement d'identifier une limite supérieure pour k_{biol} (la barre d'erreur supérieure). (Joss et al., 2006).

IV. Elimination des produits pharmaceutiques par des bioréacteurs à membrane

Actuellement, plusieurs études sont menées afin d'étudier et d'optimiser l'élimination des produits pharmaceutiques par des bioréacteurs à membrane. L'objectif de ce paragraphe est de dresser l'état de l'art de l'élimination de composés pharmaceutiques par ce procédé.

4.1. Mécanismes possibles d'élimination de produits pharmaceutiques par des bioréacteurs à membrane

Différents mécanismes sont présents lors de l'élimination de composés pharmaceutiques par des bioréacteurs à membrane. Parmi ces mécanismes, certains sont importants pour l'élimination de micropolluants polaires :

1. **Rétention physique par les membranes et adsorption sur les membranes.** Bien que l'on ne peut pas exclure des interactions d'affinité possibles matériau membranaire/molécules, ces mécanismes n'ont pas d'importance pour les produits pharmaceutiques, car leurs dimensions moléculaires sont bien inférieures à la taille de pores des membranes de micro ou ultrafiltration utilisées dans les bioréacteurs à membrane, ainsi que les aires et les sites d'adsorption disponibles sur la surface (matériau membranaire) de la membrane qui sont limités par la formation du dépôt (De Wever et al., 2007).
2. **L'adsorption des molécules sur la biomasse épuratrice.** L'élimination des produits pharmaceutiques par sorption sur les matières en suspension est un mécanisme important pour les composés hydrophobes et composés de charges positives avec des groupes fonctionnels (par exemple, des amines)(Réf, projet Européen POSEIDON).
3. **Biodégradation.** Théoriquement, pour les micropolluants hydrophiles, l'adsorption serait négligeable, et l'élimination aura lieu principalement par biodégradation. De plus, à l'exception du Ketoprofen qui a pu être utilisé comme unique source de carbone et d'énergie par les microorganismes, la transformation par cométabolisme est un facteur important pour la dégradation de pharmaceutiques acides, donc polaires (Ibuprofen, Naproxen, diclofenac, bezafibrate). (Quintana et al., 2005).
4. **Stripping par aération.** En considérant le coefficient de partage Octanol-eau ($\log K_{ow}$), la constante de Henry (k_H) et le système d'aération, il est possible de déterminer que la volatilisation est négligeable pour la plupart des composés pharmaceutiques acides ou polaires (Clara et al., 2005a). Cependant, les procédés biologiques équipés avec une aération de grosses bulles tel que le bioréacteur à membrane immergée représentent une exception, en raison du débit plus élevé d'air qui entre en contact avec les eaux usées par rapport aux fines bulles d'aération: dans ce cas, des composés volatils (par exemple les fragrances de parfums) peuvent être enlevés en quantité significative (Réf, POSEIDON).

4.2. Avantages potentiels des bioréacteurs à membrane pour l'élimination de micropolluants

Théoriquement, plusieurs conditions existantes durant les traitements par des bioréacteurs à membrane peuvent favoriser la biotransformation et la minéralisation des micropolluants :

1. Les bioréacteurs à membrane opèrent généralement à des âges de boues élevés. Ceci permet l'adaptation de microorganismes en général, et en particulier, des bactéries spécifiques à croissance lente. De cette façon, le consortium des microorganismes sera plus diversifié avec une plus large capacité physiologique (Clara et al, 2005b).
2. Les concentrations fortes en biomasse permettent l'intensification des processus biologiques et peuvent favoriser l'interaction entre micro-organismes ainsi que les éventualités des échanges d'information génétique entre eux (De Weber et al. 2007).
3. Etant donnée la concentration élevée en biomasse, la quantité des substrats disponibles pour les microorganismes est plus faible, ce qui pourrait amener à une minéralisation plus complète des polluants organiques. En effet, à fortes charges massique, les microorganismes préfèrent métaboliser les composés les plus facilement biodégradables, tandis qu'à faibles charges massiques, il ne reste pas d'autre option que de dégrader les composés les plus récalcitrants (Clara et al., 2005a ; De Weber et al. 2007).

4.2.1. Aspects microbiologiques d'un bioréacteur à membrane

Witzig et al, (2002) ont étudié les aspects microbiologiques d'un bioréacteur à membrane immergée pour le traitement aérobie d'eaux résiduaires domestiques. Les résultats suggèrent que les bactéries présentes dans la biomasse fortement concentrée du réacteur à membrane (rétention complète des microorganismes) ne sont pas dans un état physiologique caractéristique de croissance et utilisent l'énergie fournie pour satisfaire leurs besoins en énergie d'entretien. Les fonctions d'entretien incluent le mouvement général du matériel cellulaire, le remplacement continu des protéines et de l'ARN, le travail osmotique pour maintenir les gradients de concentration et la mobilité de cellules. Les bactéries ne peuvent alors se développer seulement si l'énergie est fournie en excès. Quand la concentration maximale en biomasse est atteinte, les besoins en énergie d'entretien de la biomasse seront à peine satisfaits par l'apport limitant de substrat et la croissance nette sera donc très proche de zéro.

Dans des conditions de limitation en substrat, les bactéries peuvent utiliser avantageusement une propriété qui est de dégrader un substrat spécifique en augmentant la quantité d'une enzyme spécifique, en améliorant l'efficacité d'enzymes pour la catalyse à de basses concentrations en substrat, ou en augmentant les types d'enzymes afin que de multiples substrats puissent être métabolisés (LaPara et al, 2006).

4.2.2 Comparaison entre les bioréacteurs à membrane et les stations d'épuration classiques dans l'élimination de produits pharmaceutiques.

Les données de la littérature sur ce sujet sont encore très limitées et contradictoires (Clara et al., 2005a, 2005 b ; Joss et al., 2005, 2006 ; Quintana et al., 2005). Les éliminations rapportées dans ces études font allusion à la disparition du composé parent, pas nécessairement à la minéralisation complète des composés jusqu'à obtenir du CO₂ et de l'eau.

Certains auteurs signalent de meilleures performances d'élimination par rapport aux stations d'épuration classiques pour nonylphenols et nonylphenol ethoxylates (Petrovic et al., 2003 ; Gonzales et al., 2006b), pour plusieurs pharmaceutiques acides (Kimura et al., 2005 ; Quintana et al., 2005), pour le diclofenac, le mecoprop et les sulfophenylcarboxylates (Bernhard et al., 2006) et pour les benzothiazoles (Kloepfer et al., 2004). D'autres auteurs concluent que le taux d'épuration dans les bioréacteurs à membrane et les stations d'épuration sont semblables pour certains composés pharmaceutiques (Reemtsma et al., 2002 ; Clara et al., 2005a ; Joss et al., 2005).

Nous allons par la suite présenter les résultats les plus pertinents de certaines études concernant ce sujet :

Performances semblables pour les deux procédés

En augmentant l'âge de boues à plus de 15 jours, Clara et al. (2005b), ont trouvé que l'élimination de micropolluants est améliorée pour tout type de procédés biologiques. Lorsqu'un bioréacteur à membrane (immergée) et un pilote d'une station d'épuration ont été opérés au même âge de boues, l'élimination de micropolluants par les deux procédés a été similaire.

Reemtsma et al. [2002] ont indiqué que pour l'élimination de certains polluants organiques polaires (du naphthalène, des sulfonates et des benzothiazoles) les bioréacteurs à membrane n'ont pas de meilleures performances que des procédés à boues activées classiques.

Joss et al. (2005) ont étudié l'élimination de sept composés pharmaceutiques dans les unités biologiques de plusieurs stations d'épuration. L'élimination observée des composés pharmaceutiques a été principalement due à la transformation biologique et varie de <10% (Carbamazepine) à >90% (ibuprofène). Il n'est pas possible d'établir une relation directe entre la structure et l'activité pour les transformations biologiques.

Pour les composés étudiés (carbamazépine, diclofenac, ibuprofène, naproxène, roxithromycine, sulfaméthoxazole, N-4-acétyl-sulfaméthoxazole), les taux d'élimination observés pour les différents bioréacteurs utilisés (boues activées, bioréacteur à membrane et biofiltre), ainsi que pour des âges de boues entre 10 et 60-80 jours et des températures entre 12°C et 21°C sont comparables.

Pour finir, nous citons une des conclusions du Projet POSEIDON concernant les performances des bioréacteurs à membrane pour l'élimination de composés pharmaceutiques : la plupart des éliminations de produits pharmaceutiques réalisées avec un bioréacteur à membranes (micro ou ultrafiltration) sont comparables à un traitement classique par boues activées fonctionnant à un âge de boues identique. Pour les composés exigeant une augmentation de l'âge de boues pour être éliminés, les bioréacteurs à membrane donnent généralement de meilleurs résultats car ils sont souvent à des âges de boues de 20 à 50 jours, alors que les traitements par boues activées classiques sont pour la plupart de 10 à 15 jours. La plus petite taille des particules de boue trouvée dans les bioréacteurs à membrane (diamètre moyen $> 50 \mu m$ par rapport à $300-500 \mu m$) pourrait être favorable à la dégradation de composés où la diffusion est un facteur limitant (c'est-à-dire $k_{\text{biol}} > 100 \text{ L/g/j}$); néanmoins pour des raisons pratiques, ce fait est d'importance mineure, car l'accent est mis principalement sur l'augmentation du rendement d'épuration des composés récalcitrants et dans ce cas le transfert de masse par diffusion n'est pas un facteur limitant de la dégradation.

Performances dépendant des molécules

De Wever et al. (2007), comparent les performances d'un bioréacteur à membrane (BàM) et un pilote d'un système à boues activées (BA) pour l'élimination de micropolluants. Les micropolluants étudiés sont de nature polaire et représentent un large éventail de biodégradabilité [mélange de 2 naphthalènes monosulfonates (NSA) et de 6 disulfonates (NDSA) ; du Diclofenac ; du sel disodium d'éthylènediamine tétra l'acétate (EDTA) et du Benzothiazole-2-sulfonate (le sel de sodium, BTSA)]. Les données expérimentales indiquent que le traitement par BàM pourrait largement augmenter l'élimination des micropolluants 1,6 - 2,7 -- disulfonate de naphthalène (NDSA) et benzothiazole-2-sulfonate. En outre le 1,5-NDSA, EDTA et le diclofénac n'ont pas été dégradés ni dans le BàM ni dans le BA. Les autres composés ont été dégradés aussi bien dans les deux systèmes. Ils concluent que le traitement par bioréacteur à membrane semble favoriser l'élimination de micropolluants avec une biodégradabilité intermédiaire. Pour des micropolluants

facilement biodégradables ou pour ceux difficilement biodégradables, le bioréacteur à membrane ne montre pas une différence significative en termes d'efficacité globale d'élimination de micropolluants. Cependant, le bioréacteur à membrane, réduit le temps de latence pour la dégradation de micropolluants et montre un fort effet de mémoire de dégradation (conservation au niveau génétique de l'information permettant la dégradation du polluant), ce qui implique que les bioréacteurs à membrane répondraient rapidement à des changements dans la concentration à l'entrée du procédé. En plus le Bàm s'est avéré être moins sensible aux variables opératoires du système.

Au préalable, nous avons cité l'étude menée par Joss et al. (2006) qui calculent les constantes de dégradation biologiques des 35 composés pharmaceutiques. Ces constantes ont été évaluées pour des boues provenant d'un bioréacteur à membrane et pour les boues provenant d'une station d'épuration classique. Le tableau 4.2.2.1 montre qu'il existe une grande variabilité des constantes cinétiques k_{biol} observées lors de la comparaison des différents types de boues.

D'après les auteurs, les caractéristiques de boues suivantes doivent être de grande influence :

- La diversité de l'activité de la biomasse en raison des différences dans la population microbienne ou en raison de l'activité enzymatique exprimée (par exemple l'âge des boues; Clara et al., 2005b; Ternes et al., 2004).
- La fraction réellement active de la biomasse dans l'ensemble des solides en suspension.
- La taille de floc des boues pour des composés facilement biodégradables (la diffusion dans les flocs étant la condition limitante).

Pour la plupart des composés avec une k_{biol} au-dessous de 50 L/g/j, les constantes cinétiques légèrement plus faibles trouvées dans les Bàm par rapport aux procédés à boues activées (BA) est supposée être causée par l'augmentation de l'accumulation de la matière inerte dans les boues de Bàm (Bàm : 30 - 40 jours d'âge des boues; BA: 10-12 jours). Néanmoins, pour certains composés une différence beaucoup plus élevée d'activité a été observée entre les deux types de boues. Des valeurs 10 fois plus petites pour la constante k_{biol} ont été observées dans les boues des Bàm pour l'acide fenofibrique et le gemfibrozil, tandis que pour le paracétamol et le bezafibrate, les performances du Bàm sont beaucoup plus élevées par rapport au BA.

Tableau 4.2.2.1. Coefficients de sorption de boues activées K_d et des constantes de vitesse de dégradation observée k_{biol} en expériences batch avec des boues activées d'une station d'épuration d'eaux usées municipales (Joss et al., 2006).

Utilisation	Composé	K_d (L/g)	K_{biol} pour BA (L/g/j)	K_{biol} pour BâM (L/g/j)
Antibiotiques	Azithromycin	0.38 ± 0.09^a	≤ 0.13	≤ 1.5
	Clarithromycin	0.26 ± 0.095^a	≤ 0.5	≤ 2.0
	(Anhydro-) erythromycin	0.165^c	≤ 0.12	≤ 1.1
	N4-acetyl-sulfamethoxazole	--	5.9 - 7.6	3.2 - 5.0
	Roxithromycin	--	≤ 0.2	≤ 0.3
Analgésiques/ anti-inflammatoires	Diclofenac	$0.16 \pm 0.003^{b,e}$	≤ 0.1	≤ 0.1
	Fénoprophène	0.026^e	10 - 14	3.3 - 5.9
	Ibuprofène	0.007 ± 0.002^b	21 - 35	9 - 22
	Indométhacine	0.028^e	≤ 0.3	≤ 0.21
	Naproxen	0.013^e	1.0 - 1.9	0.4 - 0.8
	Paracetamol	0.0004^e	58 - 80	106 - 240
Agents de contraste	ATH	--	1.3 - 1.9	1.1 - 1.3
	DAMI	--	1.9 - 4.9	1.9 - 4.5
	Diatrizoate	--	≤ 0.1	≤ 0.1
	Iohexol	--	1.8 - 2.4	1.1 - 2.0
	Iomeprol	--	1.2 - 1.6	0.5 - 1.0
	Iopamidol	--	≤ 0.36	≤ 0.1
	Iopromide	0.011 ± 0.001^b	1.6 - 2.5	1.0 - 2.0
	Acide Iothalamique	--	≤ 0.24	≤ 0.14
	Acide Ioxithalamique	--	0.2 - 0.7	0.3 - 0.6
Régulateurs de lipides	Bezafibrate	--	2.1 - 3.0	3.4 - 4.5
	Acide Clofibrique	0.005 ± 0.003^b	0.3 - 0.8	0.1 - 0.23
	Acide Fénofibrique	--	7.2 - 10.8	0.4 - 1.7
	Gemfibrozil	0.075^e	6.4 - 9.6	0.5 - 1.8

La gamme indique l'intervalle de confiance 95% obtenues lors de deux expériences batch (12 échantillons, pris sur deux jours). Le signe « \leq » indique que la limite inférieure a été au-delà de la résolution expérimentale. BA: Procédé à boues activée classique, âge de boues 10-12 jours; BâM: pilote bioréacteur à membrane, âge de boues 30-40 jours.

a Göbel et al. (2005). b Ternes et al. (2004). c Jones et al. (2002). e Urase et Kikuta (2005).

Meilleures Performances sur le BâM

De Wever et al. (2004) montrent que l'élimination de sulfonates d'alkylbenzene (molécules facilement biodégradables) a été légèrement supérieure, mais aussi que l'effluent du bioréacteur à

membrane contenait des quantités plus faibles du métabolite le plus récalcitrant, le sulfophenylcarboxylate.

Radjenovic et al. (2007) ont étudié le devenir de plusieurs produits pharmaceutiques de différentes catégories thérapeutiques (des analgésiques, des anti-inflammatoires, des régulateurs de lipides, des antibiotiques, etc.) lors du traitement d'eaux usées dans un bioréacteur à membrane pilote (BàMI, membrane planes). Les résultats ont été comparés avec l'élimination de ces composés par un traitement classique par boues activées (BA). Ces composés ont des propriétés physico-chimiques différentes (c'est-à-dire neutre, ionique, hydrophile, hydrophobe). Les produits pharmaceutiques sont, en général, éliminés dans une plus large mesure par le BàM que par les boues activées classiques. Pour la plupart des composés étudiés les performances du BàM ont été meilleures (pourcentage d'élimination > 80%) et les concentrations dans l'effluent (sortie du système), par exemple, pour le diclofénac, le kétoprofène, la ranitidine, le gemfibrozil, le bezafibrate, la pravastatine, et l'ofloxacine ont été plus régulières que pour le procédé à boues activées. De temps en temps le rendement d'épuration a été très similaire, et élevé, pour les deux traitements (par exemple pour l'ibuprofène, le naproxène, l'acétaminophène, la paroxétine, et l'hydrochlorothiazide). La carbamazépine était le plus persistant des produits pharmaceutiques et n'a pas été dégradé, ni par le BàM ni par le procédé à boues activées. Pour la plupart des composés étudiés les concentrations à la sortie du BàM ont été sensiblement plus faibles que dans les effluents de traitement par boues activées conventionnel (Tableau 4.2.2.2).

L'élimination de l'hydrochlorothiazide et la paroxétine a été légèrement meilleure dans les boues activées que dans le BàM. Il n'y a pas de relation entre les structures de composés cibles et leur élimination au cours du traitement. La gamme de variation de l'efficacité d'élimination par le système BàM était petite pour la plupart des composés. Dans le traitement conventionnel (Boues activées) de plus grandes fluctuations ont été observées. L'efficacité d'élimination du procédé à boues activées était beaucoup plus sensible aux changements des conditions opératoires (température, débit, etc...) (Radjenovic et al., 2007).

Tableau 4.2.2.2. Pourcentages moyen d'élimination pour certains composés pharmaceutiques par bioréacteur à membrane (BàM) et par boues activées (BA). (Radjenovic et al., 2007 ; Bernhard et al., 2006)

Groupe	Composé	% élimination Bioréacteur à Membrane	% élimination Boues activées
Analgésiques et anti-inflammatoires	Naproxène	99.3 ^a	85.1 ^c
	Ketoprofène	91.9 ^a	51.5 ^c
	Ibuprofène ^d	99 ^b	97 ^b
		99.8 ^a	82.5 ^c
	Diclofénac ^e	58 ^b	24 ^b
		87.4 ^a	50.1 ^c
	Indométhacine	46.6 ^a	23.4 ^c
	Acétaminophène	99.6 ^a	98.4 ^c
	Acide méfénamique	74.8 ^a	29.4 ^c
	Propyphénazone	64.6 ^a	42.7 ^c
Agents Anti - ulcère	Ranitidine	95.0 ^a	42.2 ^c
Médecine Psychiatrique	Paroxétine	89.7 ^a	90.6 ^c
Antiépileptique	Carbamazepine ^f	< 10 % ^a	< 10 % ^c
		13 ^b	7 ^b
Antibiotique	Ofloxacine	94.0 ^a	23.8 ^c
	Sulfaméthoxazole	60.5 ^a	55.6 ^c
	Erythromycine	67.3 ^a	23.8 ^c
β bloquants	Atenolol	65.5 ^a	< 10 % ^c
	Metrorolol	58.7 ^a	< 10 % ^c
Diurétiques	Hydrochlorothiazide	66.3 ^a	76.3 ^c
Hypoglycémiques	Glibenclamide	47.3 ^a	44.5 ^c
Régulateurs de lipides et Cholestérol	Gemfibrozil	89.6 ^a	38.8 ^c
	Bezafibrate	95.8 ^a	48.4 ^c
	Acide Clofibrique ^e	71.8 ^a	27.7 ^c
		54 ^b	26 ^b
	Pravastatin	90.8 ^a	61.8 ^c

(a) Valeurs moyennes pour n= 10 échantillons, âge de boues de BàM > 230 jours (Radjenovic et al., 2007). (b) Valeurs moyennes pour n= 9 échantillons, âge de boues de BA 12-14 jours, de BàM >230 jours (Bernhard et al., 2006). (c) Valeurs moyennes pour n= 8 échantillons, âge de boues de BA 3 jours (Radjenovic et al., 2007). (d) Composé classé comme facilement biodégradable dans BàM et BA selon (Bernhard et al., 2006). (e) Composé classé comme difficilement biodégradable dans BA mais facilement biodégradable par BàM selon (Bernhard et al., 2006). (f) Composé classé comme difficilement biodégradable dans BA et BàM selon (Bernhard et al., 2006).

Kimura et al. (2007) ont étudié l'élimination de six produits pharmaceutiques acides (acide clofibrique, diclofénac, l'ibuprofène, le kétoprofène, acide méfénamique, et le naproxène) dans une station d'épuration réelle à l'aide d'un système de boues activées et des bioréacteurs à membrane. Les temps de rétention de solides de la station d'épuration et les deux bioréacteurs

ont été 7, 15 et 65 jours, respectivement. Le taux d'élimination a varié d'un composé à l'autre. Les bioréacteurs à membrane conduisent à des pourcentages d'élimination pour les produits pharmaceutiques examinés plus élevés que la station d'épuration. Ces résultats montrent aussi que les boues des bioréacteurs à membrane ont de grandes capacités spécifiques d'adsorption principalement en raison de leur grande surface spécifique. Malgré les capacités de sorption des boues, les auteurs suggèrent que le principal mécanisme d'élimination des produits pharmaceutiques dans les procédés étudiés a été la biodégradation. Les auteurs estiment que la biodégradation de diclofénac, qui a été supposé initialement comme récalcitrant à la biodégradation, semble se produire très lentement malgré tout.

Synthèse

En comparant les résultats de la littérature sur l'élimination des micropolluants par bioréacteur à membrane et par des boues activées classiques, nous pouvons avancer que le principal avantage de bioréacteurs à membrane réside dans la gamme de composés avec un taux d'élimination modéré par des procédés à boues activées classique (BA). Pour ces composés, les Bàm sont capables de fournir des concentrations à la sortie du procédé plus faible et plus stable par rapport aux procédés à boues activées classiques. Pour les composés facilement biodégradables comme pour la plupart de composés récalcitrants, les Bàm ne montrent pas de différences significatives.

4.3 Influence des conditions opératoires sur l'élimination de micropolluants pharmaceutiques polaires.

4.3.1 Temps de séjour Hydraulique (TSH)

De Wever et al. (2007), ont comparé les performances d'un bioréacteur à membrane immergée et d'un pilote de boues activées pour l'élimination de micropolluants organiques. Lors des expérimentations faites avec de l'eau résiduaire domestique, les variations du temps de séjour hydraulique variant entre 7 et 20 h, n'ont pas modifié l'efficacité d'élimination de micropolluants. Ils supposent qu'un temps de séjour minimum est nécessaire pour une dégradation optimale, lequel semble être situé au-dessus de 5h. De la même façon, Joss et al. (2005) ont signalé que le TSH a une faible influence sur l'élimination de pharmaceutiques et fragrances. Chen et al. (2008) n'observent pas d'influence du TSH (8 h, 5.3 h et 3.9 h) sur l'élimination du Bisphénol A.

De même, Weiss et Reemtsma (2008) affirment qu'un temps de séjour hydraulique de 7 heures semble suffisant pour l'élimination des micropolluants par des BâM. Une augmentation à 14 heures ne représente pas d'améliorations significatives sur l'élimination.

4.3.2 L'âge de boues

Bernhard et al. (2006) a observé pour le diclofénac, des rendements d'élimination entre 8% et 38% à des âges de boues de 20 à 48 jours, de 59% à un âge de boues de 62 jours, et 53% à un âge de boues de 322 jours.

Joss et al. (2005) ont signalé que l'élimination des produits pharmaceutiques dans les traitements biologiques ne montrent pas une dépendance à l'égard de l'âge de boues pour les composés étudiés (carbamazepine, diclofenac, ibuprofen, naproxen, roxithromycin, sulfamethoxazole, N4-acetyl-sulfamethoxazole), car des taux d'élimination comparables ont été observés pour les différents bioréacteurs (boues activées, bioréacteur à membrane et biofiltre), ainsi que pour des âges de boues entre 10 et 60-80 jours et des températures entre 12°C et 21°C.

Weiss et Reemtsma (2008) ont étudié l'influence de l'âge de boue sur l'élimination des micropolluants polaires. Le potentiel d'un bioréacteur à membrane (échelle laboratoire) d'éliminer des polluants polaires des eaux usées municipales a été étudié pour des produits chimiques industriels et ménagers, sur une période de 22 mois. Une faible tendance à l'amélioration de l'élimination est observée en augmentant l'âge de boues de 26 jours à 37 jours, mais il reste statistiquement insignifiant. L'augmentation de l'âge de boues à 102 jours semble défavorable pour un composé qui était censé être dégradé par cométabolisme. Ils suggèrent qu'un âge de boue de 26 jours est suffisamment élevé pour obtenir une élimination adéquate.

Toutefois, Kimura et al. (2007) signalent une dépendance des taux d'élimination des produits pharmaceutiques sur l'âge de boues; le bioréacteur fonctionnant à un âge de boues de 65 jours a clairement montré une meilleure performance que le bioréacteur à membrane à un âge de boues de 15 jours en particulier pour l'acide clofibrique, le diclofénac, le kétoprofène, et le naproxen. Cette conclusion est conforme à la constatation faite par Clara et al. (2005a).

Clara et al. (2005a) ont étudié différentes technologies pour le traitement d'eaux résiduaire telles que les boues activées et les bioréacteurs à membrane. Ils ne trouvent pas de différences

significatives dans l'efficacité du traitement de micropolluants quand ces deux systèmes opèrent à des âges de boues similaires. Cependant, les bioréacteurs à membrane permettent des âges des boues élevées dans des réacteurs compacts, ce qui représente des grandes vitesses volumétriques de réaction par rapport à des systèmes de traitement classiques. Certains composés étudiés ont été éliminés en fonction de l'âge de boues, tandis que le carbamazépine n'a pas été affecté durant le traitement. Par rapport au Bisphenol-A, à l'ibuprofène, au bezafibrate et aux estrogènes naturels, une forte corrélation entre la concentration dans l'effluent et l'âge de boues a été observée. Pour ces substances, une valeur critique a été identifiée pour l'âge de boues d'environ 10 jours à une température de référence de 10 ° C. Finalement ils suggèrent que, pour des stations d'épuration fonctionnant à des âges de boues supérieurs à 10 jours des faibles concentrations dans l'effluent peuvent être atteintes, ce qui conduit à une réduction significative des émissions.

4.3.3 Le pH

Comme nous l'avons déjà évoqué, deux mécanismes principaux, l'adsorption et la biodégradation, sont généralement responsables de l'élimination de produits pharmaceutiques dans le traitement biologique des eaux usées. L'influence du pH sur le processus d'adsorption des micropolluants est plus amplement étudiée que l'influence de ce paramètre sur la capacité de biodégradation de micropolluants.

Urase et al. (2005) ont étudié la dégradation de dix composés pharmaceutiques (Acide clofibrigue, ibuprofène, gemfibrozil, fenoprofène, ketoprofène, naproxène, diclofenac, indométhacine, propylphénazone et carbamazépine) dans un bioréacteur à membrane (immergées). Une importante élimination de substances pharmaceutiques acides a été obtenue dans des conditions de pH faible ($\text{pH} < 5$), car à ces conditions, ces pharmaceutiques ne sont pas ionisés et augmentent leur hydrophobicité, ce qui augmente la tendance à l'adsorption de ces substances sur la biomasse. Les auteurs affirment que les substances adsorbées n'ont pas été accumulées dans le bioréacteur, et elles ont été biologiquement biodégradées.

4.3.4 Concentration en micropolluant à l'entrée du procédé

Dans leur étude, De Wever et al. (2007) suggèrent que, dans les conditions utilisées, la dégradation du 1,3-NDSA ne pourrait être déclenchée que par une augmentation de la concentration de 3 à 6 $\mu\text{g/l}$. Par contre dans les niveaux de concentrations testées, une

augmentation dans la concentration à l'entrée n'a pas d'incidence sur l'élimination du 1,5-NDSA, de l'EDTA ou du diclofénac. Ils supposent que les caractéristiques intrinsèques structurales autant que les niveaux de concentration d'un micropolluant donné déterminent son sort dans le traitement. Finalement, ils font l'hypothèse, pour certains composés, de l'existence d'un seuil minimal de concentration au dessous duquel la biodégradation n'a pas lieu sans pour autant le quantifier. Cependant ils excluent une augmentation graduelle du taux d'élimination avec l'élévation de la concentration en micropolluant à l'entrée du procédé.

Mahnik et al. (2007) ont évalué la biodégradation du 5-FU (Fluorouracile, un composé cytostatique) sur des expériences en réacteurs batch avec de la boue activée. Ils ont trouvé que le pourcentage de dégradation a été directement proportionnel à la concentration initiale. Joss et al. 2006, signalent que la dilution de l'eau résiduaire est supposée diminuer le degré de dégradation biologique de micropolluants. Cette même observation est faite par Lesjean et al. (2004). Bernhard et al., 2006, indiquent que l'élimination de 2,4 – dichlorobenzoic acid dans une station d'épuration et dans un bioréacteur à membrane dépend de la concentration de ce composé à l'entrée du procédé. À des concentrations supérieures ou égales à $0,40 \mu\text{g} / \text{L}$, les rendements de dégradation atteignent des niveaux d'environ 80%, alors que à de plus faibles concentrations, des rendements inférieurs à 80% ont été obtenus.

V. Influence des conditions opératoires et de la toxicité sur l'activité microbienne et sur les performances d'un bioréacteur à membrane

Les conditions opératoires jouent un rôle important sur le bon fonctionnement d'un bioréacteur à membrane. L'objectif de ce paragraphe est de récapituler l'information retrouvée dans la littérature sur l'influence des conditions opératoires et de la toxicité sur l'activité microbienne et sur les performances du bioréacteur à membrane. Les variables étudiées sont l'influence du cisaillement, de l'âge de boues, de la concentration en oxygène dissous, de la toxicité de certains composés organiques avec un intérêt particulier sur leur influence sur l'activité microbienne et la stabilité des agrégats.

5.1 Influence du stress hydrodynamique

Les influences du cisaillement ont déjà été signalées sur des différents aspects (Kim Jae-Seok et al., 2001 ; Wisniewski et Grasmick, 1998): altération de la morphologie, libération des composés

intracellulaires ou extracellulaires, variation de la viabilité de la biomasse, et changements dans la filtrabilité de la suspension.

Kim J.S. et al (2001) ont étudié l'influence du cisaillement généré par la pompe de circulation sur les performances d'un bioréacteur à membrane externe. Le cisaillement a généré la libération de particules et de produits organiques colloïdaux provenant des agrégats microbiens, engendrant la perte rapide de la perméabilité de la membrane par la formation d'un gâteau à couches denses sur la surface de la membrane. Les propriétés de filtration du media filtrant diminuent parce que la taille moyenne des agrégats bactériens diminue, la taille des particules colloïdales est réduite et s'approche de la taille de pores de la membrane. Par ailleurs, la concentration des particules colloïdales aussi bien que des substances polymériques extracellulaires solubles augmente. Plus le cisaillement de la pompe est fort, plus les agrégats microbiens sont détruits. La diminution du taux spécifique de consommation d'oxygène comme conséquence du cisaillement imposée par la pompe correspond à la perte d'activité microbienne, qui conduit à une diminution du rendement de l'utilisation du substrat, ce qui induit une concentration plus élevée de la DCO dans le réacteur et donc une perte de l'efficacité d'élimination de la DCO.

5.2 Influence de l'âge de boue

L'état physiologique bactérien s'est avéré avoir un effet sur le colmatage de la membrane (Defrance L. et al., 2000). Lacoste et al. (1992) ont noté que le flux perméable est demeuré stable pendant la croissance rapide de biomasse mais s'est affaibli quand la croissance a ralenti. Un compromis doit être trouvé entre une boue relativement jeune avec une croissance bactérienne rapide et une boue plus ancienne qui améliore la nitrification et réduit l'excès de boues.

Pour clarifier l'effet du temps de rétention de boues sur les performances et le comportement microbien dans un bioréacteur à membrane immergée pour le traitement des eaux résiduaires domestique, Xia Huang et al. (2001) ont utilisé un bioréacteur avec un temps de rétention hydraulique de 5 h et plusieurs âges de boues : 5, 10, 20 et 40 jours. Le bioréacteur atteint des pourcentages de dégradation de la DCO et de l'azote ammoniacal supérieurs à 90% presque indépendamment de l'âge de boues. Avec un âge de boues prolongé, les concentrations des solides en suspension et des solides volatils en suspension dans le bioréacteur ont augmenté, tandis que les paramètres cinétiques de croissance de la biomasse, le rendement de production de boue Y et le coefficient de maintenance, ont diminué.

Han Sung-Soo et al. (2005) ont étudié l'effet du temps de rétention de boues sur l'activité biologique spécifique, sur l'élimination de la DCO, de l'azote et du phosphore, et sur le colmatage de la membrane. Quatre âges de boues ont été étudiés : 30, 50, 70 et 100 jours. Ils suggèrent que des âges de boues extrêmement prolongés donnent des effets nuisibles sur les performances d'un bioréacteur à membrane. L'élimination de l'azote a été améliorée avec l'augmentation de l'âge de boues jusqu'à 70 jours mais le rendement d'épuration a diminué à 100 jours, en raison de la faible croissance de la biomasse et des taux de dénitrification faibles. Lors de leur étude, le colmatage de la membrane a augmenté avec l'âge de boues, probablement dû à la grande quantité de particules colmatantes et à l'augmentation de la viscosité liquide. Les auteurs concluent que des âges de boues prolongés provoquent des effets nuisibles sur l'activité spécifique de la biomasse : le taux spécifique de consommation d'oxygène, le taux spécifique de nitrification et le taux spécifique de dénitrification ont diminué. Ils suggèrent que les effets nuisibles pourraient être expliqués par la diminution du taux de transfert de substrat et d'oxygène et à l'accumulation de la biomasse inerte.

5.3 Influence de la concentration en oxygène dissous

Wilen et Balmer (1999) ont étudié les variations de la structure et de la taille des agrégats de la boue activée à différentes concentrations en oxygène dissous dans des réacteurs complètement mélangés (échelle pilote). Ils ont observé une tendance vers de plus gros agrégats pour les plus fortes concentrations en oxygène dissous. De plus, les agrégats produits à hautes concentrations en oxygène dissous étaient plus compacts que ceux produits à faibles concentrations en oxygène. A des faibles concentrations en oxygène dissous (0.5-2.0 mg/l) la défloculation est plus importante et la turbidité dans l'effluent et dans le surnageant du réacteur plus élevée qu'à des fortes concentrations en O_2 (2.0-5.0 mg/l). Les raisons principales expliquant la perte des propriétés de floculation sont la croissance excessive des bactéries filamenteuses et la formation des agrégats poreux. Pendant les cycles aérobies/anaérobies, la proportion de petits agrégats (entre 2 et 20 μm) augmente graduellement pendant les phases d'anaérobie. Dès que la phase aérobie débute le nombre de petits agrégats diminue.

Byung Chol et al (2006) ont étudié l'effet de la concentration d'oxygène dissous (O_2) sur la performance de la microfiltration et sur la physiologie microbienne dans des bioréacteurs à membrane opéré en séquence de batch (MSBR). Deux bioréacteurs à membrane immergée ont été utilisés en parallèle, un en phases aérobie/anoxie et un en phase seulement aérobie. Le bioréacteur en phases aérobie/anoxie montre une élévation plus rapide de la pression

transmembranaire, correspondant à un plus grand colmatage de la membrane, comparé au bioréacteur en phase aérobie. Les analyses de la distribution des tailles des particules et de la résistance spécifique du gâteau indiquent que les agrégats dans la phase aérobie/anoxie, plus petits que dans la phase aérobie, tendent à former un gâteau dense et compact sur la surface de membrane et à provoquer une résistance hydraulique plus élevée. Le colmatage irréversible de la membrane s'est également développé plus rapidement dans le bioréacteur aérobie/anoxie que dans le bioréacteur aérobie.

Wilén et son équipe (Wilén B.M et al., 2000), ont étudié l'influence de l'activité microbienne sur la cohésion des agrégats de la boue activée dans des expériences de courtes durées (0 à 3 heures). La limitation en oxygène peut causer la défloculation rapide des agrégats de la boue activée. Une inhibition de la production de substances polymériques extracellulaires (EPS) par les bactéries aérobies pourrait être la raison, suggérant qu'une production continue d'EPS soit nécessaire pour maintenir la structure du floc. La force de cohésion des agrégats augmente lorsque l'activité aérobie des microorganismes est stimulée par l'ajout de substrats. La défloculation a lieu lorsque l'activité aérobie des microorganismes est inhibée par : des conditions d'anaérobiose, l'addition des inhibiteurs métaboliques *azide* (NaN_3) et chloramphenicol (inhibent la synthèse d'ATP et des protéines, respectivement), la réduction de la température à 4°C.

5.4 Influence de la toxicité

Il y a deux aspects importants sur le devenir des composés toxiques organiques dans les procédés de traitement des eaux résiduaires :

1. ***La biodégradation des toxiques organiques lors du traitement. Il est souhaitable que les xénobiotiques soient transformés en CO_2 ou, au moins, en métabolites moins toxiques.***

Les cultures mixtes sont particulièrement importantes quand l'accent est mis sur la minéralisation complète des produits organiques toxiques en CO_2 . Beaucoup d'études de cultures pures ont prouvé que les intermédiaires toxiques s'accumulent pendant la biodégradation, parce qu'un bioconsortium simple n'a pas la capacité de minéraliser complètement le composé xénobiotique (Sahinkaya et al., 2005).

Les bioréacteurs à membrane (BàM) offrent un grand potentiel sur la dégradation par voie biologique des produits organiques en concentrations faibles (niveau de traces) présents dans les eaux résiduaires municipales. L'âge de boues correspond approximativement à l'inverse du taux de croissance. Seulement les microorganismes pouvant se développer pendant ce temps pourront être retenus dans le bioréacteur. Selon cette définition, de grands âges de boues permettent l'enrichissement en bactéries se développent lentement et par conséquent, l'établissement d'un bioconsortium plus complexe avec de plus larges possibilités physiologiques comparées à des procédés à bas âges de boues. En outre, si un composé est présent seulement au niveau de traces (ng/L ou quelques µg/L) la dégradation de cette substance ne représente pas un apport significatif sur la croissance de la biomasse. Ces produits chimiques sont habituellement transformés par un cometabolisme (Clara M. et al., 2005b).

La connaissance sur la formation de métabolites stables est aussi importante pour évaluer le devenir des produits pharmaceutiques dans l'environnement. Tandis que la transformation des produits pharmaceutiques dans le corps humain et dans celui d'autres mammifères a été étudiée intensivement, la dégradation microbienne de tels composés, leurs voies de dégradation et les sous-produits, ont été rarement étudiés et sont en grande partie inconnue (Quintana et al., 2005). Dans le cas de l'ibuprofène les métabolites microbiens ont été identifiés (Zwiener et al., 2002), ils étaient, cependant, identiques aux métabolites humains (Buser et al., 1999). De même, des métabolites hydroxylés du carbamazépine ont été récemment identifiés. On retrouve ces métabolites dans les eaux résiduaires à des concentrations plus élevées que le carbamazépine lui-même (Miao et Metcalfe, 2003).

2. Influence des composés organiques toxiques sur les microorganismes épurateurs.

Les effets principaux des toxiques sur le procédé de boue activée sont : la diminution de la capacité épuratrice de la DBO et de la DCO, l'inhibition de la nitrification, l'efficacité réduite dans la séparation de solides, et la modification des propriétés de compression de la boue (Bitton Gabriel, 1994, Henriques, 2005). Witzig et al. 2002 jugent qu'une plus grande sécrétion de polysaccharides pourrait avoir lieu dès que les micro-organismes sont en présence de substances inertes ou toxiques. Bura et al. 1998 constatent une augmentation de la concentration en polysaccharides et protéines à chaque fois qu'interviennent des problèmes de moussage et de foisonnement d'une boue activée.

Diosini et al. (2007) affirment que l'exposition continue aux micropolluants pourrait augmenter l'effet inhibiteur ou, au contraire, l'acclimatation et / ou la sélection de la biomasse pourrait réduire l'effet inhibiteur. Sahinkaya et al (2005) ont étudié des boues activées non acclimatées et des boues activées acclimatées pour tester leur capacité à dégrader le 4-chlorophenol en utilisant des réacteurs aérobies en batch. Ils ont observé que la toxicité de 4-chlorophenol sur la culture diminue remarquablement après acclimatation. De plus ils n'ont pas observé une dégradation de 4-chlorophenol avec les boues activées non acclimatée, alors que la dégradation a été presque complète par les boues activées acclimatée.

Henriques et al, (2005) signalent que les procédés de boue activée qui entraînent la formation de plus petits agrégats sont plus sensibles à l'inhibition de la respiration par les composés solubles toxiques, comparés aux processus où la taille des agrégats est plus grande. Les systèmes de MBR peuvent entraîner la formation de plus petits agrégats par l'accumulation des colloïdes non-biodégradables, la rupture des agrégats provoquée par un taux de cisaillement important et/ou des taux élevés d'aération dans le compartiment à membrane (cas des membranes immergées).

Visvanathan et al (2005) ont étudié la biodégradation du pentachlorophenol dans un bioréacteur à membrane. Le pentachlorophénol (PCP) est un produit chimique toxique, employé souvent dans la formulation de pesticides, d'herbicides et de bactéricides. Un taux d'épuration de PCP de 99% et de DCO de 95% ont été obtenus pour un temps de séjour hydraulique de 12 heures et à une concentration en solides en suspension de 10.000 mg/l. Ils suggèrent que le niveau toxique de PCP dans les eaux à traiter peut induire la sécrétion de substances polymères extracellulaires par les micro-organismes comme un mécanisme de protection, qui simultanément augmente la viscosité de la liqueur mixte.

5.4.1 Influence des micropolluants sur des procédés de traitement biologique.

Lorsque les micropolluants contaminent les eaux usées, ils atteignent les systèmes de traitement biologique pouvant influencer les performances des stations d'épurations d'une manière négative, en raison de la possibilité d'inhibition de l'activité biologique. Bien que beaucoup des recherches sont orientées vers l'étude d'élimination de micropolluants peu d'attention est accordée à l'influence de micropolluants sur le rendement des procédés des traitements biologiques (Reemtsma et al., 2002 ; Petrovic et al, 2003 ; De Wever et al., 2004 ; Kloepfer et al., 2004 ; Lesjean et al., 2004 ; Clara et al., 2005a, 2005b ; Joss et al., 2005 ; Kimura et al., 2005 ; Quintana

et al., 2005 ; Urase et al., 2005 ; Gonzales et al., 2006a, 2006b; Bernhard et al., 2006 ; Joss et al., 2006 ; De Wever et al., 2007), et sur les mécanismes de élimination (Byrns, 2001 ; Clara et al., 2005a ; Quintana et al., 2005 ; Urase et Kikuta, 2005 ; Dionisi et al., 2006 ; De Wever et al., 2007). En ce qui concerne l'effet de micropolluants en alimentation continue sur des procédés de boue activée, les métaux lourds sont les plus étudiés (Barth et al., 1965, Pettet, 1956, Tomlinson et al., 1966, Beyenal et al., 1977). Jusqu'à présent aucun rapport n'a évalué l'effet des cytostatiques sur les procédés de traitement biologiques.

Dionisi et al., (2007) ont étudié l'effet de micropolluants sur la performance d'un procédé de traitement biologique. Cependant, les concentrations utilisées lors de cette étude sont assez importantes. Les réacteurs (Sequencing Batch Reactors) ont travaillé pendant de longues durées (au moins 11 mois) et dans un large éventail d'âges des boues (5-30 jours). Les micropolluants utilisés dans cette étude étaient un mélange synthétique comportant : du benzène 1.8 mg/L, du 1,3,5-trichlorobenzène 1mg/L, du phénol 5 mg/L, du pentachlorophénol 4mg/L, du pyrène 0.1 mg/L, du 4-nonylphénol 4mg/L, de l'acide 4-dodecylbenzenesulfonique 10mg/L, du 2,4-dichlorobiphényl 0.18mg/L, du naphthalène 4.2 mg/L, du decachlorobiphényl 0.0002 mg/L, du $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 mg- Cd/L et du PbCl_2 10 mg Pb/L.

En ce qui concerne les performances globales du procédé, ils ont observé que la production de boues, l'élimination de la DCO facilement biodégradable et les propriétés de décantation n'ont pas été affectées de manière significative par la présence de micropolluants. Les résultats obtenus dans cette étude montrent que l'effet le plus important est une réduction de l'élimination de l'azote. Cela confirme des conclusions antérieures (Pettet, 1956; Tomlinson et al., 1966). Les micropolluants diminuent de manière significative l'efficacité de l'élimination de l'azote (l'élimination de l'azote ammoniacal diminué de 82% sans micropolluants à 29-37% avec micropolluants).

Par rapport à l'activité des micro-organismes nitrifiants, l'activité de micro-organismes cultivés sans micropolluants a été grandement réduite (environ 50%) par l'adjonction des micropolluants, alors que les micropolluants résiduels après traitement n'ont exercé aucun effet inhibiteur.

Le bilan de nitrates effectués sur les 4 tests confirme que la fraction de micro-organismes nitrifiants est beaucoup plus élevée dans le réacteur sans micropolluants 4,5% de VSS) que dans les réacteurs alimentés avec des micropolluants (maximum 0,5% de VSS). Toutefois, dans les réacteurs alimentés avec des micropolluants, la fraction de micro-organismes nitrifiants a augmenté avec l'augmentation de l'âge des boues. Malgré cet effet, une élimination satisfaisante de l'azote n'a pas été atteinte dans l'ensemble de test aux conditions expérimentales utilisées.

Un autre aspect important qui ressort de ces résultats est que non seulement les micro-organismes nitrifiants mais aussi les micro-organismes hétérotrophes sont inhibés par les micropolluants. L'activité de micro-organismes cultivés sans micropolluants a été réduite de 20% en présence de micropolluants. Les microorganismes hétérotrophes cultivés en présence de micropolluants ont montré un rendement maximal d'assimilation du substrat inférieur au rendement des micro-organismes cultivés sans micropolluants. **Finalement, les résultats indiquent que l'exposition continue de micro-organismes à ces micropolluants donne des floes plus réguliers, arrondis, et compacts.**

Il semble que l'acclimatation à elle seule n'est pas suffisante pour améliorer l'élimination de l'azote dans des procédés de boue activée alimentés avec des micropolluants, au moins dans le cas d'une inhibition grave, telle que celle causée par les substances et les concentrations utilisées dans cette étude (Diosini et al., 2007). Ainsi, en présence d'une inhibition importante due à des mélanges de micropolluants, on peut s'attendre à ce que des procédés de boues activées fonctionnant à de très hauts âges de boues, puissent conduire à une amélioration significative sur l'élimination de l'azote. Or, de très longs âges de boues dans des procédés biologiques de traitement d'eaux résiduaires peuvent être obtenus par des bioréacteurs à membrane.

Dans une autre étude, Kargi et al., (2005) montrent que lorsque le 4-chlorophénol était la seule substance inhibitrice, une amélioration de la nitrification est observée lorsque l'âge de boues est passée de 5 à 25 jours (Kargi et al., 2005)

5.4.2 Rôle des substances polymères extracellulaires dans la réponse aux toxiques

Des observations microscopiques ont montré que les floes des boues activées sont des structures poreuses à plusieurs niveaux dans lesquelles les macrofloes sont formés par de petits agrégats ou micro-colonies (Jorand et al., 1995; Andreadakis, 1993). La cohésion de cette structure à plusieurs niveaux est dictée par de nombreux facteurs, dont l'hydrophobicité intérieure (Jorand et al., 1998; Liao et al., 2001), la composition des substances polymères extracellulaires (EPS) (Dignac et al., 1998; Higgins et Novak, 1997b), et les liaisons des cations polyvalents (Higgins et Novak, 1997a) pour les plus important. Plus précisément, il est communément accepté que les substances polymères extracellulaires, qui sont essentiellement composées de protéines et de polysaccharides, forment une matrice semblable au gel dans laquelle les micro-colonies sont fixées par des forces électrostatiques et hydrophobes (Henriques et Love, 2007). La similitude entre les biofilms et les

flocs des boues activées est inéluctable. Par conséquent, les théories développées pour les biofilms pourraient être valables pour les flocs. L'une des propriétés les plus étudiées des biofilms est leur plus grande résistance aux substances antimicrobiennes en comparaison avec des cellules bactériennes libres en suspension (Costerton et al., 1999; Mah et O'Toole, 2001; Stewart, 2002). Plusieurs hypothèses existent en ce qui concerne les mécanismes responsables de ces comportements. L'impossibilité de la toxine à pénétrer dans le biofilm par la présence d'EPS est un des mécanismes proposés (Leriche et al., 2003).

Il est légitime de supposer que les EPS protègent les bactéries dans le floc des boues activées de composés toxiques ayant le potentiel d'interagir avec les EPS, tels que les toxines hydrophobes et positivement chargées. Par exemple, les résidus chargés négativement dans les protéines liées aux EPS peuvent capturer des espèces cationiques de métaux lourds, entraînant une réduction de la toxicité parce que le métal est moins biodisponible par rapport à des systèmes sans d'importantes quantités d'EPS. La liaison de métaux lourds avec des EPS a été démontrée dans la littérature (Guibaud et al., 2005; Liu et al., 2001).

Henriques et Love (2007) ont étudié l'inhibition de la respiration induite par l'octanol (hydrophobique), le cadmium (métal lourd chargé ioniquement), le N-Ethylmaleimide ou NEM (hydrophobique et oxydante) et le cyanure (hydrophile), sur la boue activée. Des cisaillements mécaniques ont été appliqués aux boues activées afin de produire des flocs de différentes structures. Des tests de respiration ont été effectués sur les boues cisillées et non cisillées. Les résultats ont montré que le cisaillement mécanique produit la libération de biopolymères dans la phase liquide provenant de la matrice de substances exopolymériques formant les flocs, et une réduction simultanée de la taille de flocs. Le cisaillement imposé n'a pas eu d'impact sur la viabilité de la biomasse. L'inhibition de la respiration par l'octanol et le cadmium est plus importante dans les boues cisillées que dans les boues non cisillées. En revanche, l'inhibition de la respiration induite par le NEM et le cyanure, était similaire pour toutes les différentes liqueurs mixtes testées. Sur la base des résultats obtenus dans cette étude, les principales conclusions sont les suivantes:

- Les EPS dans les flocs de boues activées protègent la communauté bactérienne contre les produits chimiques qui interagissent avec la matrice de polymères, en empêchant l'accès du produit chimique jusqu'aux cellules bactériennes.

- La structure et la taille des floes ne jouent pas un rôle important dans la réponse des boues activées à des toxiques hydrophiles et solubles, tels que le cyanure ou le NEM. Les toxiques hydrophiles solubles sans charge ont plus de facilité à diffuser dans la matrice d'EPS.

VI. Conclusions et objectifs

Les différents problèmes résultant des rejets liquides des services de santé suscitent un questionnement sur le devenir des polluants hospitaliers dans l'environnement et sur la nécessité de développer des outils de gestion durable des eaux usées de ces établissements.

Un grand pourcentage des études retrouvées dans la littérature se focalisent autour du constat de la présence de composés pharmaceutiques dans l'environnement et leurs risques potentiels. Un pourcentage moins élevé présente des mécanismes de rémédiation (Ozonation, traitement biologiques, etc). Finalement, seul un pourcentage très faible montre l'influence de micropolluants sur les procédés de traitement biologique. Jusqu'à présent, aucun article ne discute l'influence de composés cytotoxiques sur la biomasse épuratrice.

Concitant la littérature sur l'élimination de micropolluants par bioréacteurs à membrane, nous remarquons qu'elle est limitée et dans une certaine forme contradictoire. La majorité des articles se concentrant sur l'élimination de la molécule mère, sans tenir compte de la formation de métabolites lors de leur transformation, et de l'élimination de la toxicité liée à ces molécules. Pourtant, la compréhension plus détaillée du comportement des produits pharmaceutiques dans le traitement des eaux résiduaires exige la considération de leurs métabolites microbiens et l'élimination de la toxicité associée à la molécule mère et/ou aux métabolites.

D'une manière générale, les bioréacteurs à membrane offrent des avantages sur l'élimination des micropolluants pour des composés avec un taux d'élimination modéré lors du traitement par des procédés de boues activées classiques (BA). Les BâM sont capables de fournir, pour ces composés, des concentrations à la sortie du procédé plus faibles et plus stables par rapport aux procédés de boues activées classiques.

Par rapport aux conditions opératoires, a priori, le temps de séjour hydraulique (TSH) n'a pas une influence importante sur l'élimination de micropolluants, par contre un TSH minimum de 5 heures est conseillé.

Le temps de rétention des boues a une influence majeure sur l'efficacité de la dégradation biologique, principalement en raison de son influence sur la diversité de la population microbienne et sur la multitude des voies de dégradation exprimées. Pour certains composés pharmaceutiques, l'augmentation de l'âge de boues améliore leur transformation, tandis que pour d'autres, le temps de rétention de solides n'a aucune influence remarquable sur leur transformation. Néanmoins, un temps de rétention de solides minimum de 10 jours (à 10°C) est recommandé par la littérature.

Lors du traitement des eaux résiduaires par boues activées, les produits pharmaceutiques sont éliminés principalement par deux mécanismes : la biodégradation et l'(ad)sorption.

Pour les composés hydrophiles, comme les produits pharmaceutiques acides, la biodégradation est le mécanisme le plus important. Le taux de dégradation observée de divers composés diffèrent de manière significative sans aucune corrélation évidente avec la structure moléculaire. De plus, à l'exception du Ketoprofen qui a pu être utilisé comme unique source de carbone et d'énergie par les microorganismes, la transformation par cométabolisme est un facteur important pour la dégradation de composés pharmaceutiques hydrophiles.

Pour les composés hydrophobes ou chargés positivement, l'adsorption des composés sur la boue activée est un mécanisme prédominant. Pour certains composés pharmaceutiques (par exemple, le Bisphenol A dans Chen et al., 2008) le processus d'adsorption du composé sur la boue est suivi du processus de biodégradation.

Dans le cadre de cette problématique, bien que l'acclimatation de la boue soit une étape très importante pour la dégradation de micropolluants, le paramètre clé semble être l'âge de boues car l'augmentation du temps de rétention des solides, permettrait le développement d'un consortium très varié et la production d'enzymes cataboliques amplifiant la possibilité de minéraliser cette molécule et ses métabolites. On étudiera ici 50 et 70 jours, avec les contraintes de longueur expérimentale que cela implique (durées des campagnes d'au moins 3 fois l'âge de boues pour un rendu significatif de résultats).

A priori l'ajout de micropolluants, augmenterait la production d'EPS, diminuerait l'activité biologique de micro-organismes hétérotrophes et autotrophes et changerait la distribution des tailles de flocs. Cette étude s'appuiera donc sur des paramètres tels que, le rendement d'épuration

de la DCO, de l'azote, la distribution de la taille de particules, l'activité de la boue activée et le suivi du colmatage de la membrane.

Finalement, nous rappelons les objectifs de cette étude :

- Evaluer le potentiel des bioréacteurs à membrane pour la dégradation du cyclophosphamide, ainsi que pour l'élimination de sa toxicité.
- Rechercher l'effet du cyclophosphamide et de ses métabolites sur les performances globales du procédé et sur l'activité de la biomasse épuratrice ainsi que sur les propriétés physico-chimiques de la liqueur mixte et les conséquences sur le colmatage.

Chapitre II.

Matériels et méthodes

Ce chapitre présente les différents appareillages et méthodes expérimentales utilisés dans cette étude. La première partie présente les caractéristiques de l'effluent utilisé et les bioréacteurs à membrane externe employés. Par la suite, nous récapitulerons les conditions opératoires appliquées, pour finir avec la description des techniques analytiques mises en œuvre. Les deux dernières parties décrivent la méthode utilisée pour le suivi de l'activité biologique et précisent la méthode employée pour évaluer l'adsorption du cyclophosphamide sur la boue d'un des bioréacteurs à membrane.

2.1 L'effluent

L'effluent alimentant les bioréacteurs est un mélange d'eau résiduaire domestique et d'une solution synthétique. La description de ce mélange est présentée ci dessous.

2.1.1 Caractéristiques de l'eau résiduaire urbaine

L'eau résiduaire urbaine (ERU) alimentant les réacteurs est prélevée dans le réseau d'assainissement de la commune de Brax. L'eau collectée deux à trois fois par semaine subit un tamisage (1mm puis 200 μ m) afin d'enlever un maximum de sable pouvant endommager les pompes de recirculation. L'eau est stockée dans une cuve agitée et réfrigérée à 4°C.

Le tableau 2.1.1 regroupe les concentrations moyennes en MES, Azote totale et DCO de l'ERU durant toutes les périodes de fonctionnement des réacteurs.

Tableau 2.1.1 Concentrations moyennes en DCO, Azote et MES de l'eau résiduaire de Brax durant les campagnes expérimentales.

	Durant la campagne I	Durant la campagne II
DCO totale (mg.L ⁻¹)	203.56 \pm 115.62	404.27 \pm 353.85
DCO surnageant (mg.L ⁻¹)	115.62 \pm 57.572	200.44 \pm 75.97
DCO soluble (mg.L ⁻¹)	109 \pm 51.43	182.34 \pm 71.95
Azote soluble (mg.L ⁻¹)	43.19 \pm 15.98	50.58 \pm 15.48
MES (g.L ⁻¹)	0.174 \pm 0.114	0.393 \pm 0.376
Débit d'alimentation (L.J ⁻¹)	9.26 \pm 1.31	14.30 \pm 1.23

2.1.2 Caractéristiques du Viandox®

Le **Viandox®** est un assaisonnement proposé par l'industrie agroalimentaire. La fiche technique du produit est présentée dans l'annexe 1. L'utilisation d'une solution de Viandox® permet d'ajuster la charge appliquée en modifiant la concentration en DCO. Cette solution est obtenue en diluant avec de l'eau distillée le produit Viandox®. Cette préparation est réalisée deux fois par semaine. Les caractéristiques de cet effluent sont apportées sur le tableau 2.1.2.

Tableau 2.1.2 Concentrations moyennes en DCO et en Azote soluble dans la solution Viandox® diluée durant les campagnes expérimentales.

	Durant la campagne I	Durant la campagne II
DCO (g.L ⁻¹)	94 ± 10	184.12 ± 69.04
Azote soluble (g.L ⁻¹)	5.43 ± 1.27	9.33 ± 5.19
Débit d'alimentation (L.J ⁻¹)	0.225 ± 0.021	0.108 ± 0.00928

2.1.3 Composés pharmaceutiques utilisés

La molécule cible choisie dans cette étude est le Cyclophosphamide (CAS No. 50-18-0, ICSC No. 0689) :

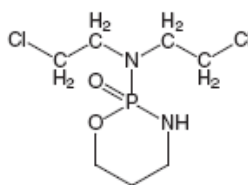


Figure 2.1.3.1 Structure du Cyclophosphamide : bis (2-chloroethyl)-1, 3,2-oxazaphosphinan-2-amine 2-oxide. Formule chimique : C₇H₁₅Cl₂N₂O₂P.

Le cyclophosphamide est une poudre cristalline blanche sans odeur, avec un poids moléculaire de 261,1 et un point de fusion de 49,5 ° C à 53 ° C. Il est soluble dans l'eau (1 :25) et dans l'éthanol (1 :1); légèrement soluble dans le benzène, l'éthylène glycol, le tétrachlorure de carbone, et de dioxane et peu soluble dans l'éther éthylique et l'acétone. Son coefficient de partage octanol-eau est égale à log Kw 0,63. Le cyclophosphamide réagit avec les agents oxydants forts, est sensible à l'humidité et à la lumière (IARC 1981).

Le cyclophosphamide est chimiquement stable pour des longues périodes (28 jours environ) à 4°C. Gilard et al., (1994) ont étudié l'hydrolyse chimique du cyclophosphamide et sa stabilité. Les résultats le plus remarquables sont présentés dans le tableau 2.1.3.1 :

Tableau 2.1.3.1 Stabilité du cyclophosphamide (Gilard et al., 1994)

Stabilité du cyclophosphamide
<ul style="list-style-type: none"> • Après 19 semaines (-20°C) 4% est hydrolysé. • 20°C pH 3.4 Après 7 jours 1% est Hydrolysé. • 20°C pH 5.4 Après 7 jours 5% est Hydrolysé. • 20°C pH 6.9 Après 7 jours 5% est Hydrolysé. • 20°C pH 7.4 Après 6 jours 5% est Hydrolysé. • 37°C pH 7.4 Après 6 jours 45% est Hydrolysé. • (24-27°C) pH 3 et 10 Après 4 j 10% Après 14 j 30%. (Brooke et al, 1973). • Le CP est un composé instable en solution alcaline (pH > 9.11).

Dans nos conditions opératoires (25-32°C, pH 7-7.7, Temps de séjour hydraulique 32-48H) nous nous attendons à ce que l'hydrolyse du cyclophosphamide soit négligeable (<10%). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé un test de stabilité de la molécule (Test adsorption paragraphe 2.7 dans ce chapitre. Les résultats sont présentés dans le chapitre III). Les résultats confirment la stabilité de la molécule à 25°C, pendant 2 jours.

En chimiothérapie, le cyclophosphamide pourrait être utilisé seul, mais il est plus souvent utilisé simultanément ou successivement avec d'autres médicaments anticancéreux., par exemple en traitement complémentaire des **cancers ovariens**, dans le traitement des **sarcomes**, des **neuroblastomes**, dans le traitement des **lymphomes** malins (hodgkiniens et non hodgkiniens), dans le traitement des **myélomes**, dans certaines **leucémies aiguës** lymphoïdes, en préparation des **allogreffes** ou des **autogreffes** médullaires, notamment pour le recueil des cellules souches. (IARC 1975, 1981).

Le cyclophosphamide est un agent alkylant. Les agents alkylant ont en comun un mode d'action principal : production d'un radical électrophile (Ion Carbonium, aziridium) très réactif avec des atomes d'oxygène, de soufre ou d'azote de l'ADN. Ceci va inhiber la réplication et la

transcription de l'ADN, induire la libération de radicaux libres qui vont provoquer des cassures des brins d'ADN (Loichot, 2006) et ainsi limiter le développement des cellules cancéreuses.

La Figure 2.1.3.2 présente le schéma de métabolisme humain du cyclophosphamide (Huitema et al., 2001). Inactif par lui-même, sa métabolisation au niveau hépatique, aboutit à la formation de molécules plus ou moins actives et thérapeutiques pour un malade mais toxiques pour un individu sain. Le cyclophosphamide est connue pour être cancérogène pour l'homme basé sur des preuves suffisantes de cancérogénicité chez l'homme (IARC, 1981). Il est transformé par des enzymes hépatiques intracellulaires donnant des métabolites actifs alkylants, 4-hydroxycyclophosphamide, aldophosphamide, l'acroléine et moutarde phosphoramidate (Joqueviel et al, 1998). L'acroléine est responsable des effets urotoxiques du cyclophosphamide.

Ces différents métabolites du cyclophosphamide, lui confèrent en dehors de l'effet cytotoxique, des effets mutagène et tératogène (Nau et al., 1982). Son élimination est essentiellement urinaire. Le CP est retrouvé dans les urines sous forme inchangé et sous forme de produits de dégradation (15 à 36% de la dose administrée est retrouvée dans les urines après 24h, et entre 60 – 80% en 72h et jusqu'à 20% sous forme inchangé. Gilard et al., 1994 ; Steger-Hartmann et al., 1997).

Dans le cadre de cette étude un cocktail de composés pharmaceutiques contenant du cyclophosphamide et ses principaux métabolites dans des proportions respectant la stœchiométrie du métabolisme humain a été utilisé, comme modèle de ce qui peut être excrété par les urines, et dilué dans les collecteurs d'eaux usées.

Les molécules ont été fournies par NIOMECH partie de l'IIT GmbH (université de Bielefeld, universitätsstr. 25 DE-33615 BIELEFELD) : D-18844- 3 dechloroethyl ifosfamide, D-18845- 4-keto-cyclophosphamide ; D-18846 - phosphoramid mustard ; D-19990 - nitrogen mustard hydrochlorid et par SIGMA (St Quentin-Fallavier, France) 01680 Acroléine ; C0768 Cyclophosphamide.

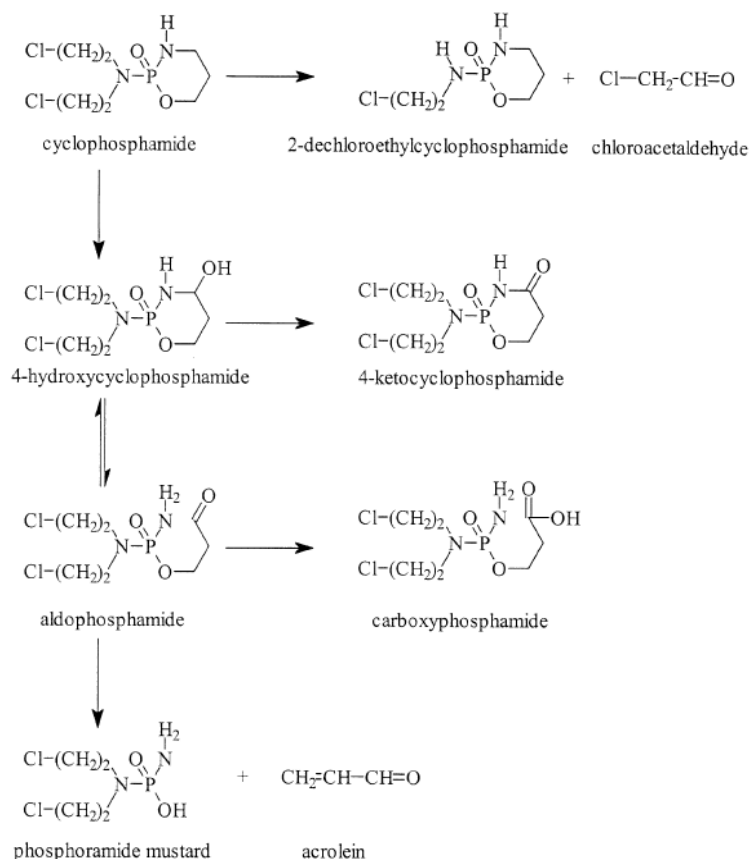


Figure 2.1.3.2 Schéma du métabolisme humain du Cyclophosphamide.(Huitema et al., 2001).

Le cocktail est préparé et stocké à -18°C en plusieurs tubes eppendorf®.

Le contenu d'un des eppendorf est dissous dans le flacon contenant la solution viandox® qui alimente le bioréacteur BÀM R1 CP. Cette opération est réalisée deux fois par semaine. Les concentrations finales ciblées en Cyclophosphamide et ses métabolites à l'entrée du BÀM R1 CP ont été les suivantes :

Tableau 2.1.3.2 Concentrations ciblées à l'entrée du BÀM R1 CP du Cyclophosphamide et ses principaux métabolites.

Cocktail de composés pharmaceutiques	
Cyclophosphamide	5000 ng/L
Acroléine	2250 ng/L
Moutarde phosphoramide	8883 ng/L
Moutarde Norazotée	517 ng/L
4-Ketocyclophosphamide	580 ng/L
Deschloroethylcyclophosphamide (DCCP)	1667 ng/L

2.1.3.1 Système de sécurité vis-à-vis du cyclophosphamide

Les médicaments cytotoxiques comme le cyclophosphamide, ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses, ils agissent aussi sur les cellules normales à prolifération rapide telles que les cellules de la moelle osseuse, les cellules de la muqueuse digestive, les gonades, la peau, les phanères. C'est de cette non-spécificité que découle leur toxicité (Loichot, 2006). Il a été constaté une très forte toxicité chez les patients traités avec de fortes doses (ex : dose par voie orale normalement entre 1 à 5 mg/kg/jour ; Buerge et al., 2006). Sa toxicité a été aussi observée chez des personnels hospitaliers (pharmaciens, infirmiers et personnel de service des hôpitaux) exposés à des doses beaucoup plus faibles lors de la préparation des solutions à administrer aux patients, leur administration, les manipulations des excréments des malades (IARC, 1987).

Webb et al., (2003) signalent qu'un souci potentiel avec les anticancéreux est la possibilité qu'un risque de cancer peut exister à n'importe quel niveau d'exposition. De ce fait, **tout contact direct avec cet agent cancérigène doit être évité**. Certaines des actions que nous avons envisagées pour diminuer les risques associés au cyclophosphamide et ses métabolites, sont présentées dans le tableau 2.1.3.1 et sur la figure 2.1.3.1 :

Tableau 2.1.3.1.1 Equipe de protection pour diminuer les risques associés au cyclophosphamide et ses métabolites.

Equipement de protection individuelle
<ul style="list-style-type: none">• Blouse imperméable.• Double gant en latex d'une épaisseur de 0,115 à 0,147 mm, usage unique (temps maximum d'usage 3h).• Masque FFP3.• Lunettes ou visière.
Equipement de protection sur le bioréacteur
<ul style="list-style-type: none">• Des bacs de rétention prévu sous le flacon en plastique contenant le cocktail pharmaceutique et sous la pompe péristaltique permettant l'ajout de ces composés dans le BÀM R1 CP.• Protection de réacteurs par des plexiglas et un système d'aspiration afin d'éviter les aérosols et les éclaboussures de boue.• Des bacs de rétention de capacité 55 L (volume du réacteur 20L) sous les bioréacteurs.



Figure 2.1.3.1.1 Système de sécurité installé sur les pilotes. (a) Hotte aspirante. (b) écran protecteur. (c) Gants (d) Bacs de rétention.

2.2 Description des pilotes

Dans cette étude, deux bioréacteurs à membrane externe ont été utilisés. Un sert de témoin (**BÀM R2 Contrôle**), tandis que l'influent de l'autre réacteur a été « dopé » avec un cocktail de cyclophosphamide et de ses principaux métabolites (**BÀM R1 CP**). Ces deux pilotes ont fonctionné en parallèle avec une alimentation identique excepté le cocktail de dopage.

Le paragraphe 2.8 en fin de ce chapitre démontre les fonctionnements parallèles des 2 pilotes hors de la présence du cocktail de composés pharmaceutiques. Cette similitude nous autorise la comparaison par la suite en présence des molécules cytotoxiques.

Le schéma du bioréacteur à membrane externe est montré sur la figure 2.2.1. Le bioréacteur est composé de deux parties principales. Une partie réactionnelle (bioréacteur) et une deuxième de séparation liquide/solide (module membranaire). Nous allons décrire chacune des parties dans les paragraphes suivants.

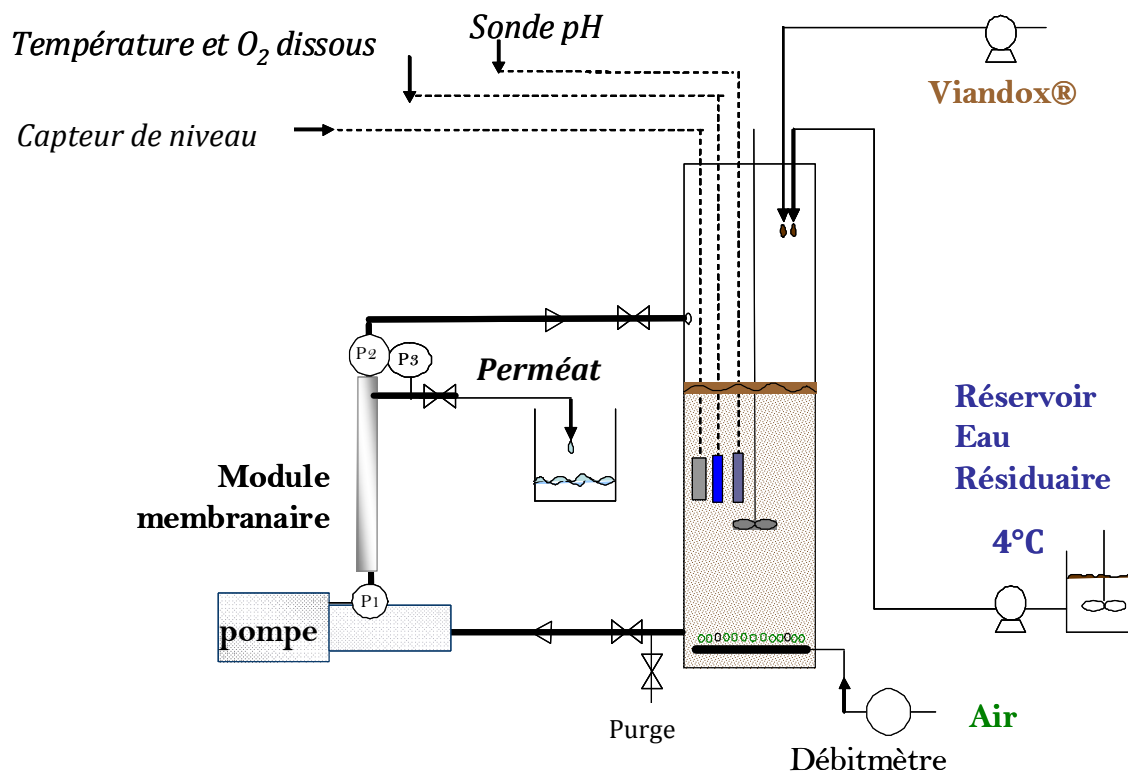


Figure 2.2.1 Schéma des bioréacteurs à membrane externe utilisés durant cette étude.

2.2.1 Bioréacteur

Le volume réactionnel du bioréacteur est de 20L. Le débit d'alimentation est régulé (entre un niveau haut et un niveau bas) à l'aide d'un capteur de niveau (Keller) pour maintenir constant le volume de liquide au sein du réacteur. Une pompe péristaltique asservie à ces niveaux alimente les pilotes en eaux résiduaire à partir d'une cuve commune. Une deuxième pompe péristaltique apporte en continu, un substrat d'appoint correspondant à une dilution de Viandox[®], additionné du cocktail pour le BAM R1 CP.

Afin de maintenir un mélange complet dans le bioréacteur, une turbine Rushton a été utilisée (Agitation 260 tour/min). Une forte agitation de la liqueur mixte augmente la qualité dans la mesure de l'oxygène dissous. Une aération séquencée s'effectue au moyen d'une membrane percée disposée au fond du réacteur, fournissant l'oxygène nécessaire à la bonne épuration. Les cycles d'aération ont été fixés à l'aide d'une minuterie de façade analogique (TMR 48, Crouzet).

La concentration en oxygène dissous, la température et le pH (Sondes Mettler Toledo) dans le bioréacteur ont été suivis.

Le logiciel DasyLab sur l'ordinateur permet d'enregistrer toutes les secondes simultanément la pression transmembranaire, le pH, la température, la concentration en oxygène dissous, la hauteur de liquide dans le réacteur.

2.2.2 Module membranaire

La membrane (MEMBRALOX[®]) permettant la séparation de l'effluent traité et de la biomasse épuratrice est placée à l'extérieur du bioréacteur. La boucle de recirculation de la liqueur mixte est assurée par une pompe volumétrique rotative (pompe à rotor excentré PCM –Moineau COMPACT modèle 1200C4). Ce pilote permet de fonctionner en filtration tangentielle. La filtration de la suspension se réalise de l'intérieur de la membrane vers l'extérieur. Le perméat est recueilli dans des bidons de 60 litres puis vidés dans l'évier. Les caractéristiques des membranes sont répertoriées dans le tableau 2.2.2.

La vitesse de tangentielle le long de la membrane est réglée par la pompe de recirculation. Une vanne placée en sortie du carter membranaire dans le circuit de recirculation, permet au besoin d'augmenter la pression à l'intérieur de la membrane. Afin de suivre les performances du réacteur et son contrôle par rapport au colmatage, on enregistre la pression transmembranaire. Fonctionnant à flux constant une augmentation du colmatage est associée à une augmentation de la pression transmembranaire. La pression est mesurée par le biais des capteurs de pression et des manomètres placés à la sortie de la pompe de recirculation juste avant l'entrée du module membranaire, à la sortie du module membranaire et dans le circuit recueillant le perméat.

Tableau 2.2.2 Caractéristiques des membranes utilisées

Matériau membrane	Céramique
Module	Tubulaire
Surface filtrante	0.0055 m ²
Seuil de coupure	0.2 µm
Fournisseur	Pall Exekia
Longueur de la membrane	25 cm
Diamètre interne/externe	7 mm/10mm

Le nettoyage des membranes est effectué par des solutions de NaOH et de HNO₃. Une solution de NaOH 2% massique et de Chlore actif de 400ppm est préparée. Les membranes sont introduites dans cette solution, puis chauffées graduellement afin d'éviter un choc thermique et de casser les membranes (jusqu'à 50°C, pendant 45 min). Les membranes sont ensuite refroidies à température ambiante et rincées avec de l'eau préfiltrée à 0.2µm. La perméabilité de la membrane à l'eau préfiltrée (0.2µm) est mesurée. Le contrôle consiste à mesurer le flux de perméation lors de la filtration d'eau préfiltrée à 0.2 µm à différentes pressions transmembranaire. La perméabilité est la valeur de la pente de la droite obtenue en traçant le flux de perméation en fonction des différentes pressions. On l'exprime en L.h⁻¹.m⁻².bars⁻¹ à 20°C.

Si la perméabilité reste basse (inférieure à 15% par rapport à la valeur initiale étant de 3200 L.h⁻¹.m⁻².bars⁻¹ à 20°C), les membranes sont trempées dans une solution de HNO₃ 0.7% massique à 50°C pendant 45 minutes. La perméabilité des membranes est à nouveau vérifiée afin de confirmer que le nettoyage est bien complet.

2.3 Conditions opératoires

Les deux bioréacteurs ont étéensemencés par de la boue activée d'une station d'épuration. Pour le démarrage, l'ensemencement est fait avec de la boue de Brax préfiltrée à 200 µm pour diminuer le sable présent dans la boue. Etant donnée la difficulté à filtrer la boue, nous avonsensemencé les bioréacteurs en 3 jours, filtrant chaque fois environ 2L de boue de la station d'épuration de Brax.

Deux campagnes expérimentales ont été menées. Le traitement est conduit en phase aérobie/anoxie pour l'élimination de la pollution azotée. Le tableau 2.3 résume les conditions opératoires pour les deux campagnes expérimentales utilisées durant cette étude.

Tableau 2.3 Conditions opératoires des bioréacteurs à membrane durant les deux campagnes expérimentales.

Paramètre	Campagne I	Campagne II
Volume réactionnel (L)	20	20
DCO totale à l'entrée (mg/L)	2609 ± 512 BÀM R1 CP 2464 ± 392 BÀM R2 Contrôle	1774.7 ± 629.6 BÀM R1 CP 1756.5 ± 680.6 BÀM R2 Contrôle
DCO soluble à l'entrée (mg/L)	2517 ± 503 BÀM R1 CP 2371 ± 387 BÀM R2 Contrôle	1490 ± 555 BÀM R1 CP 1480 ± 601 BÀM R2 Contrôle
Azote total soluble à l'entrée (mg/L)	178.61 ± 48.52 BÀM R1 CP 168.50 ± 49.38 BÀM R2 Contrôle	123.76 ± 46.82 BÀM R1 CP 121.97 ± 46.56 BÀM R2 Contrôle
Charge Volumique (Kg DCO.m ⁻³ .J ⁻¹)	1.02 ± 0.12 BÀM R1 CP 1.03 ± 0.11 BÀM R2 Contrôle	1.26 ± 0.42 BÀM R1 CP 1.28 ± 0.47 BÀM R2 Contrôle
Débit perméat visé (L.j ⁻¹)	10	15
Âge de Boue (J)	50	70
Temps de séjour hydraulique (h)	48	32
Cycle aération	2 min aération/23 min arrêt de l'aération	2 min aération/17 min arrêt de l'aération
Durée de présence d'oxygène journalière (h)	5	7.6
Concentration oxygène dissous (mg/L)	0 – 4.5	0 – 4.5
Flux perméat (20°C) (L.m ⁻² .h ⁻¹)	55.47 ± 8.37 BÀM R1 CP 56.63 ± 6.6 BÀM R2 Contrôle	83.87 ± 6.01 BÀM R1 CP 86.03 ± 5.7 BÀM R2 Contrôle
Température (°C)	25-32	25-32
pH	7-7.7	7-7.7
Mode de filtration	Interne/externe - Tangentielle	Interne/externe - Tangentielle
Débit pompe recirculation (L.h ⁻¹)	560-700	560-700
Vitesse tangentielle le long de la membrane (m/s)	4-5	4-5

2.4. Prélèvements des échantillons

Tous les échantillons pour toutes les analyses effectuées ont été pris en phase anoxie (la phase anoxie étant plus longue que la phase aérobie), afin d'assurer au maximum les mêmes conditions de prélèvement pour les deux bioréacteurs.

Le surnageant est obtenu après centrifugation de la liqueur mixte ou de l'eau résiduaire à 5000 tours/min pendant 20 minutes. Pour obtenir la fraction appelé dans cette étude « soluble », le surnageant est ensuite filtré à travers un filtre en acétate de cellulose avec une taille de pore de 0.45µm.

Bien que la taille de pore des membranes dans les bioréacteurs soit de 0,2 µm, nous avons filtré les échantillons de perméat avec un filtre 0.45µm pour garantir le même traitement des échantillons dits « solubles », permettant les comparaisons entre surnageant et perméat entre les deux réacteurs.

Les fractions solides sont conservées dans un congélateur à -18°C avant analyse, tandis que les fractions liquides (surnageant et soluble) sont conservées dans un réfrigérateur à 4°C pour les analyses faites au laboratoire LGC. Les échantillons liquides pour les analyses réalisées dans les laboratoires des partenaires du projet ANR ont été aussi congelés à -18°C.

Les prélèvements ont été réalisés deux fois par semaine. Toutefois, les prélèvements pour les analyses de granulométrie et de respirométrie ont été effectués une fois par semaine.

2.5 Techniques analytiques mises en œuvre

Une caractérisation biologique, chimique et physique du mélange réactionnel des Bioréacteurs à membrane externe a été réalisée périodiquement afin de suivre leurs évolutions. Les techniques analytiques mises en œuvre durant cette étude sont présentées ci-dessous. Les protocoles détaillés sont regroupés dans l'annexe 2.

2.5.1 Analyses des MES

Pour la mesure des matières en suspension, la méthode par centrifugation et séchage a été suivie (norme AFNOR 90-105). Une centrifugeuse 4222 Cantan Instrument équipée de godets de 50 mL de volume a été utilisée. Cette mesure est faite deux fois par semaine.

2.5.2 Mesure de la Demande Chimique en Oxygène (DCO)

La DCO correspond à la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder chimiquement les substances réductrices contenues dans la solution. L'oxydant utilisé est du bichromate de potassium. Les analyses sont faites sur l'échantillon d'eau résiduaire, sur la solution Viandox (on suspecte des modifications de composition entre les différents lots utilisés au cours de l'étude), sur le surnageant et sur la fraction soluble de l'eau résiduaire et de la liqueur mixte et finalement sur le perméat. La mesure a été effectuée suivant la méthode Hach (Odysées DR/2500 Method 8000). Les mesures ont été effectuées pour le surnageant de la liqueur mixte ou de l'eau résiduaire et sur la fraction soluble décrite au préalable.

2.5.3 Azote total

Une digestion alcaline de persulfate convertit toutes les formes d'azote en nitrate. Le metabisulfite de sodium est ajouté après la digestion pour éliminer des interférences d'oxyde d'halogène. Le nitrate réagit alors avec de l'acide chromotrope dans des conditions fortement acides pour former un complexe jaune avec un maximum d'absorbance à 410 nm. La méthode utilisée est Method 100 Test 'N' Tube Vials Programmes HACH, 395 N, Total HR TNT. Le résultat est exprimé en mg N/L. La mesure de l'azote totale a été faite sur la fraction soluble de l'eau résiduaire de Brax, sur le perméat des bioréacteurs et sur la solution de Viandox®.

2.5.4 Dosage des exopolymères (EPS)

Les exopolymères présentes ont été caractérisés par des polysaccharides exprimés en mg d'équivalent D-glucose/L, des protéines (mg d'équivalente BSA/L), et des substances humiques (mg d'équivalent acides humiques/L). Les analyses sont faites sur la solution Viandox®, sur la fraction soluble de l'eau résiduaire et de la liqueur mixte et finalement sur le perméat. Les concentrations sont exprimées en mg équivalent au composé étalon par litre d'échantillon.

2.5.4.1 Protéines et substances humiques

Les protéines sont dosées suivant la méthode de Lowry modifiée par Frolund (1995). Elle consiste à former un complexe entre les liaisons peptidiques et le sulfate de cuivre CuSO_4 , en milieu alcalin. Ce complexe réduit alors les acides phosphomolybdiques et phosphotungstiques

du réactif Phénol-Folin-Ciocalteu pour donner un second complexe de couleur bleue, mesuré au spectrophotomètre à 750 nm. Toutefois, lors de l'utilisation de cette méthode, Davis (1988) met en évidence des interférences lors de la lecture au spectrophotomètre dues aux substances humiques. Frølund et al. (1995) ont modifié alors la méthode établie par Lowry pour prendre en compte les substances humiques dans la mesure des protéines. Cette méthode est basée sur la mesure du développement de couleur en présence et en l'absence de CuSO_4 .

En présence de CuSO_4 , aussi bien les protéines que les substances humiques sont dosées. En l'absence de CuSO_4 , le développement de couleur est dû aux composés humiques et aux acides aminés chromogènes, alors que la coloration développée par le BSA est réduite de 20% (Frølund et al 1995). A partir des absorbances lues, il est alors possible de déterminer l'absorbance des protéines et des substances humiques :

$$\begin{aligned} \text{Abs totale avec CuSO}_4 &= \text{Abs protéines} + \text{Abs substances humiques} \\ \text{Abs totale sans CuSO}_4 &= 0,2 * \text{Abs protéines} + \text{Abs substances humiques} \end{aligned}$$

Des deux premières équations, il vient :

$$\begin{aligned} \text{Abs protéines} &= 1,25 * (\text{Abs totale avec CuSO}_4 - \text{Abs totale sans CuSO}_4) \\ \text{Abs substances humiques} &= \text{Abs totale sans CuSO}_4 - 0,2 * \text{Abs protéines} \end{aligned}$$

Les concentrations en protéines et en substances humiques sont établies à partir de gammes étalons réalisées entre 0 et 200 mg/L, respectivement, avec du sérum albumine bovin (Sigma A7906) et des acides humiques (Fluka 53680). Pour des concentrations en protéines inférieures à 30 mg/L, l'erreur expérimentale relative calculée lors de ces dosages a une valeur moyenne de 25%. Au-delà de cette concentration elle est de l'ordre de 10%.

2.5.4.2 Polysaccharides

La méthode colorimétrique utilisée dans notre étude est celle établie par Dreywood en 1946. Les polysaccharides sont hydrolysés et déshydratés par de l'acide sulfurique à chaud. Les monomères obtenus se complexent à l'anthrone pour donner un composé bleu-vert.

L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la quantité de sucres. L'étalonnage doit être fait soit avec un monomère correspondant au sucre majoritaire dans les sucres dosés, soit

avec l'oligo ou polysaccharide contenu dans l'échantillon s'il est identifié. Nous choisirons la glucose.

La gamme étalon est préparée avec du D-glucose (Prolabo) pour des concentrations comprises entre 2.5 et 100 mg/L. L'erreur expérimentale relative calculée lors de ces dosages a une valeur moyenne de 6,7%.

2.5.5 Evaluation du pouvoir colmatant d'une boue ou d'un surnageant

Il s'agit ici de caractériser le comportement colmatant d'un milieu biologique vis-à-vis d'un référentiel de filtration standard et identique pour les deux bioréacteurs. Les boues sont prélevées ponctuellement dans les BâM et leur pouvoir colmatant ainsi que celui des surnageants est évalué.

Le système comporte une cellule de filtration cylindrique de 60 mL de volume. Un circuit d'air comprimé permet de travailler à pression constante (Cf Annexe 3). Le volume d'eau filtré est mesuré et enregistré au cours du temps. Le schéma de l'expérience est présenté sur la figure 2.5.5.

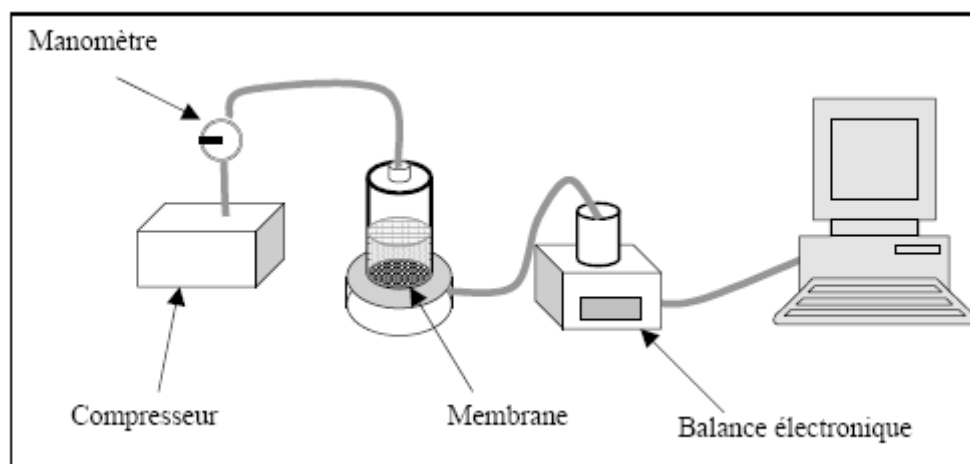


Figure 2.5.5 Schéma de l'expérience pour l'évaluation du pouvoir colmatant d'une boue ou d'un surnageant.

La filtration est de type frontale, se fait sans agitation et à pression constante fixée 0,5 bars. La surface de filtration est circulaire avec un diamètre de 45 mm. Le suivi du flux au cours du temps est effectué en pesant le perméat sur une balance et l'acquisition est automatisée (logiciel Labview). Les membranes utilisées sont des membranes en acétate de cellulose ayant des pores de 0,2 μm de diamètre pour une surface totale de 0,17 cm^2 .

La loi de Darcy modifiée par la présence d'un dépôt de boue s'écrit selon l'équation suivante :

$$J = \frac{\Delta P}{\mu(R_m + R_d)} = \frac{1}{\Omega} \cdot \frac{dV}{dt} \quad \text{Eq 2.5.5.1}$$

Avec :

- J : Flux de perméat ($\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
- ΔP : Pression transmembranaire (Pa)
- R_m : résistance de la membrane (m^{-1}).
- R_d : résistance du gâteau (m^{-1}).
- $\mu(T)$: Viscosité dynamique du fluide filtré (Pa.s).
- Ω : Surface membranaire (m^2).
- V : Volume filtré (m^3)

Le terme R_d (résistance du dépôt) augmente proportionnellement au volume filtré V et à la masse sèche de gâteau Md :

$$R_d = \frac{\alpha \cdot Md}{\Omega} = \alpha \cdot C \cdot \frac{V}{\Omega} \quad \text{Eq 2.5.5.2}$$

Avec :

- α : Résistance spécifique du gâteau de filtration ($\text{m} \cdot \text{kg}^{-1}$).
- C : quantité de matière déposée ($\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$).

En intégrant l'équation 2.5.5.1 en faisant la substitution du terme R_d , (équation 2.5.5.2) on arrive à l'expression de l'équation 2.5.5.3 :

$$\frac{t}{V} = \frac{\mu(T)}{\Delta P \cdot \Omega} \left[\frac{\alpha \cdot C}{2 \cdot \Omega} V + R_m \right] \quad \text{Eq. 2.5.5.3}$$

La viscosité dynamique est calculée pour une température T (°C) donnée du fluide (donc pour chaque série de mesure). Une hypothèse simplificatrice est faite quant à la nature du fluide, nous considérons en effet qu'il s'agit d'eau.

En suivant l'évolution de la filtration à travers la représentation t/V en fonction de V on pourra faire une régression linéaire des données et obtenir la pente de la droite qui nous conduira au produit $\alpha.C$ d'après l'équation 2.5.5.4 :

$$\alpha.C = \frac{2.pente.\Delta P.\Omega^2}{\mu} \text{ Eq. 2.5.5.4}$$

Chaque milieu biologique est donc caractérisé par sa valeur de $\alpha.C$ pour le système de référence à la pression de référence (0.5 bars).

La résistance spécifique du dépôt α (m/kg) est calculée simplement si l'on connaît la teneur de matières en suspension, C .

Dans le cas du surnageant de la liqueur mixte, où il ne s'agit plus de dépôt particulaire, la valeur de la pente (s/m^6) est appelé aussi l'indice de colmatage de la membrane (en anglais, MFI : Membrane Fouling index). (Boerlage et al., 2002).

2.5.6 Mesure de la granulométrie de la boue

L'identification de la distribution granulométrique des particules a été faite au moyen d'un granulomètre laser (Malver Mastersizer 2000) avec une longueur focale qui permet les mesures des tailles des floes sur une gamme de 0,2 à 2000 μm . Ce dernier est un appareil dont le fonctionnement est basé sur la théorie de la diffraction de Fraunhofer selon laquelle l'angle de diffraction est inversement proportionnel à la taille des particules. Les lois propres au phénomène de diffraction ne sont théoriquement applicables que dans certaines conditions :

- Les particules sont suffisamment éloignées les unes des autres.
- Le milieu est transparent et n'absorbe pas le faisceau laser.
- Les particules sont sphériques, homogènes et isotropes (Cette hypothèse n'est pas vérifiée dans le cas de floes).
- Les mouvements des particules sont aléatoires.

Les résultats sont ensuite exprimés sous forme d'histogramme en fréquence. Avant introduction dans le granulomètre, l'échantillon de boue a été dilué pour que la lumière dispersée puisse différencier les particules. La dilution effectuée est de 100, 2.5 mL de boue dans 250 mL d'eau

distillée. La solution ainsi obtenue est aspirée à travers le granulomètre au moyen d'une pompe péristaltique (Figure 2.5.6) pour ne pas endommager les floccs et les particules avant leur passage dans la cellule de mesure.

Dans cette étude, l'indice de réfraction du dispersant est considérée égale à 1.33 et correspond à l'indice de réfraction de l'eau. Quant aux floccs biologiques, ils sont constitués de matière organique, c'est pourquoi l'indice de réfraction choisi ici (1.50) est proche de celui utilisé classiquement pour ces composés, soit 1.596 (Lambert, 2000).

La distribution des tailles des particules, basée sur le volume et la taille moyenne est évaluée par le diamètre moyen équivalent calculé sur le volume ($d_{4,3}$). Pour chaque échantillon quatre passages dans le granulomètre sont pris en compte. Les résultats fournis dans cette étude correspondent à une moyenne de 3 analyses sur un même échantillon, un pourcentage d'erreur inférieur à 10% est alors obtenu.

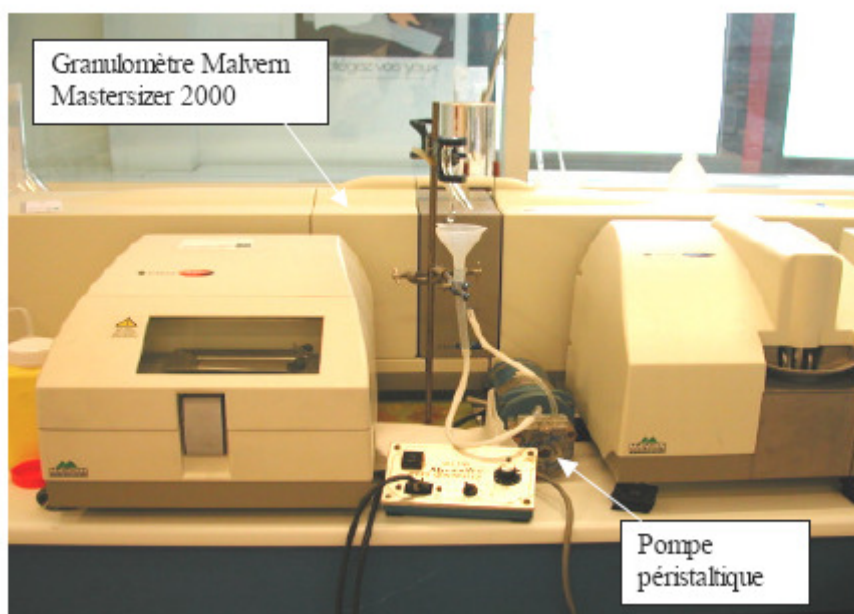


Figure 2.5.6. granulomètre laser Mastersizer 2000.

2.5.7 Microscope confocal

Le microscope confocal à balayage laser permet de réaliser des coupes virtuelles d'un échantillon en profondeur. La recombinaison de ces images permet ainsi la reconstitution de l'échantillon en 3 dimensions, grâce au logiciel LCS3D. Le microscope utilisé est un microscope confocal LEICA

statif droit (DMRXA2) équipé d'un laser Argon. (Longueurs d'ondes 458 nm, 476 nm, 488 nm et 514 nm). L'objectif utilisé permet un grossissement de 32 fois. L'observation au microscope confocal des bactéries vivantes et mortes a été réalisée après marquage par fluorescence (Live/dead BacLight® Kit (molecular probes, L7007)). Le Kit contient deux marqueurs fluorescents se fixant sur les acides nucléiques. Le SYTO 9 (Vert) dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement 488 et 500 nm. L'iodure de propidium, IP, (Violet) dont les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont respectivement 488 et 620 nm. Le SYTO 9 pénètre à la fois dans les bactéries vivantes et mortes alors que l'IP pénètre dans les bactéries dont la membrane plasmide est endommagée ; ceci atténue alors la fluorescence du SYTO 9 (Hannon et al., 2006)

2.5.8 Détection et quantification du Cyclophosphamide (CP) et 4-Keto CP.

Ces analyses ont été réalisées au Laboratoire de Biophysique et Bio-analyse (Faculté de pharmacie, Université de Montpellier, partenaire du projet ANR-TOXEAUBAM). La mise à point d'une méthode analytique permettant le dosage de la totalité de composés pharmaceutiques utilisés dans cette étude s'est avérée très difficile. De ce fait, le dosage n'a été possible que sur le Cyclophosphamide et le 4-Keto CP.

La détermination de ces composés s'effectue en deux étapes : extraction puis analyse chromatographique.

Le rendement de la méthode d'extraction et la reproductibilité de la méthode ont été mesurés à partir d'un échantillon des composés dont la concentration est connue. 100µL de cette solution (solution étalon) ont été dilués dans 100 mL d'eau ultra pure, et 100µL dans 100 ml de perméat du BÀM R2 Contrôle. Les composés sont dosés selon la procédure d'extraction ci-dessus. L'opération est répétée deux fois. Le rendement est calculé en comparant les résultats obtenus après extraction à ceux obtenus en injectant directement la solution étalon.

Le rendement d'extraction à partir des solutions aqueuses est de 75% pour le CP, 100% pour le Keto-CP. A partir du perméat, le rendement d'extraction est de 76% pour le CP, 65% pour le 4-Keto CP.

Les limites de détection de la méthode d'analyse (HPLC/MS/MS) sont les suivants :

Tableau 2.5.8.2 Limites de détection de la méthode d'analyse (HPLC/MS/MS).

	Cyclophosphamide (CP)	4-Keto-CP
<i>Dans l'eau</i>	<i>10 ng/mL</i>	<i>10 ng/mL</i>
<i>Dans le perméat</i>	<i>20 ng/mL</i>	<i>50 ng/mL</i>
<i>Quantité minimale dans un échantillon</i>	<i>3 ng</i>	<i>8 ng</i>

2.6 Suivi de l'activité biologique

Deux grands types de micro-organismes peuvent être pris en compte dans la biomasse active :

- Les **hétérotrophes** : Elles constituent la plus grande partie de la biomasse active, elles utilisent les *matières organiques comme source de carbone*. Les bactéries hétérotrophes peuvent dégrader la matière organique soit en utilisant l'oxygène dissous comme accepteur final d'électron (aérobie), soit les nitrates et les nitrites (anoxie).
- Les **autotrophes** : Ces bactéries nitrifient l'azote ammoniacal (conversion en nitrate), s'en servant comme source d'énergie, ainsi que le *carbone minéral* pour la synthèse cellulaire.

Les microorganismes de la boue activée obtiennent de l'énergie pour leur croissance et leur subsistance à partir de l'oxydation du substrat. Dans ce processus de «respiration», les électrons enlevés du substrat entrent dans la chaîne de transport d'électrons pour être pris pour un accepteur final d'électrons. Dans un environnement aérobie l'accepteur final est l'oxygène moléculaire. Par conséquent, la consommation d'oxygène est directement liée à la croissance de la biomasse et à l'élimination du substrat. La masse d'oxygène consommée par unité de volume et par unité de temps est appelée respiration ou vitesse de consommation d'oxygène. La vitesse de consommation d'oxygène, est largement reconnu comme un paramètre caractérisant la viabilité de la biomasse (Spanjers et al., 1998).

Différentes mesures de respiration sont proposées pour caractériser les boues activées (Spanjers et al., 1998; Vanrolleghem et al., 1999). Nous citons quelques unes:

- **La respiration endogène :** Elle est définie comme la vitesse de consommation d'oxygène de la boue activée en absence de substrat d'origine externe (Henze et al., 1987; Spanjers et al., 1998; Vanrolleghem et al., 1999) et résulte de la consommation de résidus cellulaires autochtones pour la formation de biomasse (concept de mort-génération), de la consommation d'énergie de maintenance et la respiration des protozoaires (Ray et Peters, 2008).
- **La respiration exogène maximale :** Il s'agit de la vitesse de consommation d'oxygène atteinte lorsque tous les substrats qui peuvent être oxydés par une population microbienne sont présents en excès. Cette condition n'est pas très probable, mais une vitesse de consommation d'oxygène en présence d'un excès d'un substrat ou d'un groupe de substrats peut être mesuré (Spanjers et al., 1998).
- **La respiration spécifique :** L'activité d'une boue peut être rapportée à sa concentration en matières en suspension (MES) ou MVS (matières volatiles en suspension). Cette activité spécifique permet d'estimer la viabilité ou la fraction active de la biomasse.

L'activité des organismes hétérotrophes et des organismes autotrophes a été régulièrement suivie dans cette étude par l'exécution de test de respirométrie, en vue d'étudier la variation de leur activité biologique. La vitesse de respiration endogène et la vitesse de respiration maximale exogène ont été évaluées.

2.6.1 Description de l'installation

Les expériences ont été menées sur un respiromètre mis au point au laboratoire. Le respiromètre utilisé dans cette étude est représenté schématiquement dans la figure 2.6.1. Il est composé principalement d'un réacteur aéré et agité de capacité de 2 litres contenant l'échantillon de boue activée (1.5 litres). Le réacteur est aéré par l'intermédiaire d'un tube perforé placé au dessous de la turbine d'agitation type Rushton (300 tours/min). Le débit d'air est contrôlé par une électrovanne pour maintenir une concentration en oxygène dissous comprise entre 2.7 et 4.2 mg/L. La température est maintenue constante (26°C). La concentration en oxygène est mesurée en continue par une sonde (YSI) reliée à un oxymètre (Le temps de réponse est de 10s pour atteindre 80% de la concentration de saturation en oxygène). La concentration en oxygène est enregistrée en continu à l'aide d'un ordinateur.

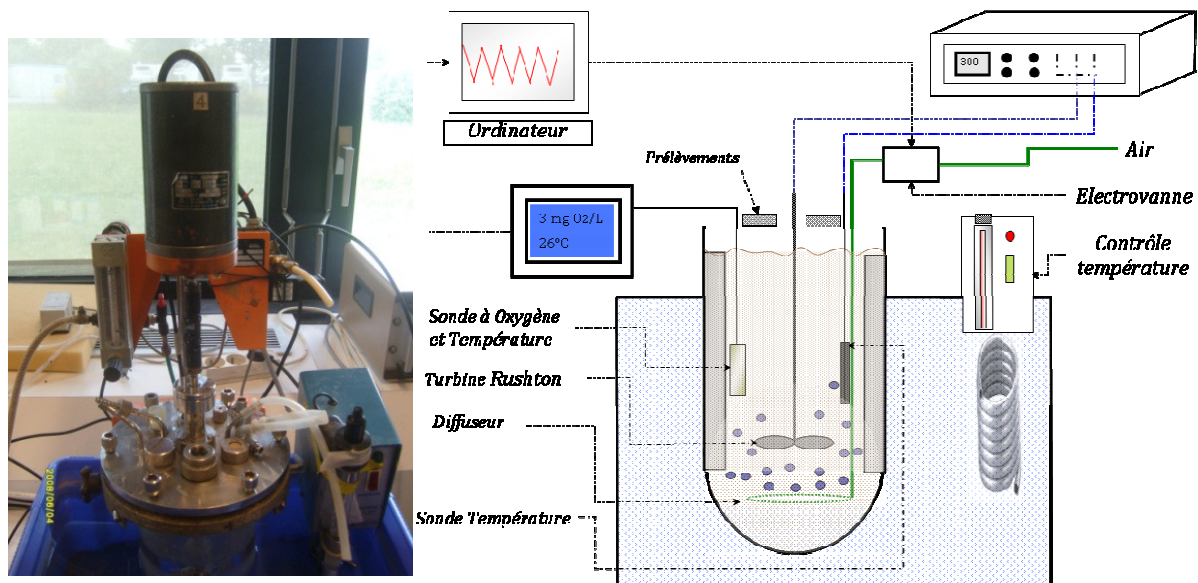


Figure 2.6.1. Schéma du Respiromètre

2.6.1.1 Les solutions utilisées

Pour les tests de respirométrie de la première campagne expérimentale, le viandox[®] a été utilisé comme substrat carboné, tandis que pour la deuxième campagne, l'acétate de sodium (CH_3COONa) a été choisi comme substrat carboné, car il est facilement biodégradable par la plupart des populations hétérotrophes. En outre, le chlorure d'ammonium (NH_4Cl) a été utilisé pour évaluer l'activité de la population nitrifiante. Une solution d'allylthiourée (ATU) à 10 g/l a été utilisée comme un inhibiteur sélectif de la nitrification : L'ATU est un inhibiteur sélectif des nitrosobactéries (*Nitrosomonas*), bactéries qui transforment l'ammonium en nitrites.

2.6.2 Obtention d'un respirogramme

Les figures 2.6.2.1(a) et (b) présentent un exemple de respirogramme. Un échantillon de boues activées (issu du BAM) est aéré et agité dans le respiromètre pendant plusieurs heures (2 à 3h minimum) sans ajout de substrat, afin de dégrader le substrat exogène résiduel des boues. Les mesures de respiration sont calculées à partir des pentes de décroissance en O_2 dissous entre deux seuils réglés de 4.2 mg/L à 2.7 mg/L. A mesure que le substrat résiduel est épuisé, les boues atteignent une respiration stable appelée « respiration endogène » ($R_{\text{endo A+H}}$ sur les figures 2.6.2.1). Après la période de stabilisation endogène une injection de substrat azoté (NH_4Cl) pour les microorganismes nitrifiants est effectuée dans le réacteur. Cette addition de substrat provoque une augmentation de la vitesse de consommation d'oxygène. Cette vitesse de consommation

d'oxygène où vitesse de consommation exogène est proportionnelle à la cinétique de biodégradation aérobie du substrat par les bactéries nitrifiantes de la boue activée (Kong et al., 1996). Si la concentration de substrat est suffisante (au moins 10 fois la constante d'affinité des microorganismes, $K_N \sim 1 \text{ mgN/L}$; Nowak et al., 1994) la vitesse de consommation d'oxygène atteindra sa valeur maximale qui correspond à la vitesse maximale de respiration. (**R éxo A** sur les figures 2.6.2.1). Une fois que tout le substrat a été oxydé la boue activée revient à la phase endogène. Un inhibiteur de l'activité résiduelle des microorganismes autotrophes est ajouté à la boue (ATU). Le même protocole est suivi mais cette fois avec l'addition d'un substrat carboné pour les microorganismes hétérotrophes. Les données sont ensuite analysées avec un logiciel développé au laboratoire **Respiro-expert**. Les tableaux 2.6.2.1(a) et (b) résument les protocoles d'analyse de respirométrie durant les deux campagnes expérimentales. Les principales différences résident dans l'ajustement de la concentration à 2 g/L en MES pour tous les échantillons de la deuxième campagne et l'ajout de substrat carboné (acétate de sodium) plus facilement assimilable que le Viandox ®.

Tableau 2.6.2.1(a) Protocole d'analyse. Respirométrie durant la première Campagne expérimentale.

Respirométrie
Campagne expérimentale I. Âge de boues de 50 jours
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Soutirage de boues du BÂM en phase anoxie.</i> • <i>Ajout de la boue dans le respiromètre. Aération jusqu'au épuiser le substrat exogène et arriver à la respiration endogène (R endo A+H).</i> • <i>Ajout du substrat azoté (NH_4Cl) pour obtenir une concentration dans le respiromètre de 13 mg N/L.(R éxo A)</i> • <i>Une fois la respiration endogène retrouvée, on ajoute de l'ATU (inhibiteur de la nitrification). Concentration dans le respiromètre en ATU égale à 10mg/L.</i> • <i>Stabilisation de la respiration endogène hétérotrophe. (R endo H)</i> • <i>Ajout du substrat carboné (Viandox®) pour obtenir une concentration dans le respiromètre de 100 mg DCO/L.(R éxo H).</i> • <i>Mesure de la concentration en oxygène dissous jusqu'à épuisement du substrat carboné exogène.</i>

Tableau 2.6.2.1 (b) Protocole d'analyse. Respirométrie durant la deuxième Campagne expérimentale.

Respirométrie
Campagne expérimentale II. Âge de boues de 70 jours
<ul style="list-style-type: none"> • Soutirage de boues du BâM en phase anoxie. • Dilution de la boue avec de l'eau distillée jusqu'à obtenir une concentration en MES de 2g/L. • Ajout de la boue (Volume total 1.6 L) dans le respiromètre. Aération jusqu'à épuiser le substrat exogène et arriver à la respiration endogène (R endo A+H). Une fois la respiration endogène atteinte, on prélève 100mL de boue pour vérifier la concentration en MES. • Ajout du substrat azoté (NH_4Cl) pour obtenir une concentration dans le respiromètre de 20 mg N/L. (R éxo A). • Une fois la respiration endogène retrouvée, on ajoute de l'ATU (inhibiteur de la nitrification). Concentration dans le respiromètre en ATU égale à 10 mg/L. • Stabilisation de la respiration endogène hétérotrophe (R endo H). • Ajout du substrat carboné (Acétate de Sodium) pour obtenir une concentration dans le respiromètre de 200 mg DCO/L. (R éxo H). • Mesure de la concentration en oxygène dissous jusqu'à épuisement du substrat carboné exogène.

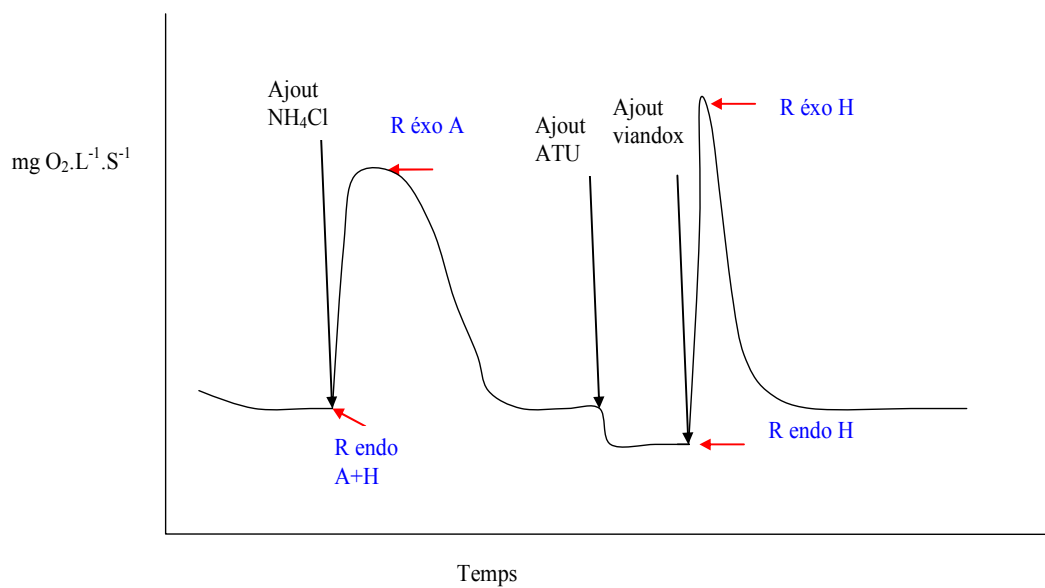


Figure 2.6.2.1(a). Exemple de respirogramme. Campagne expérimentale I. R : Respiration. Exo : exogène. A : Autotrophes. H : Hétérotrophes.

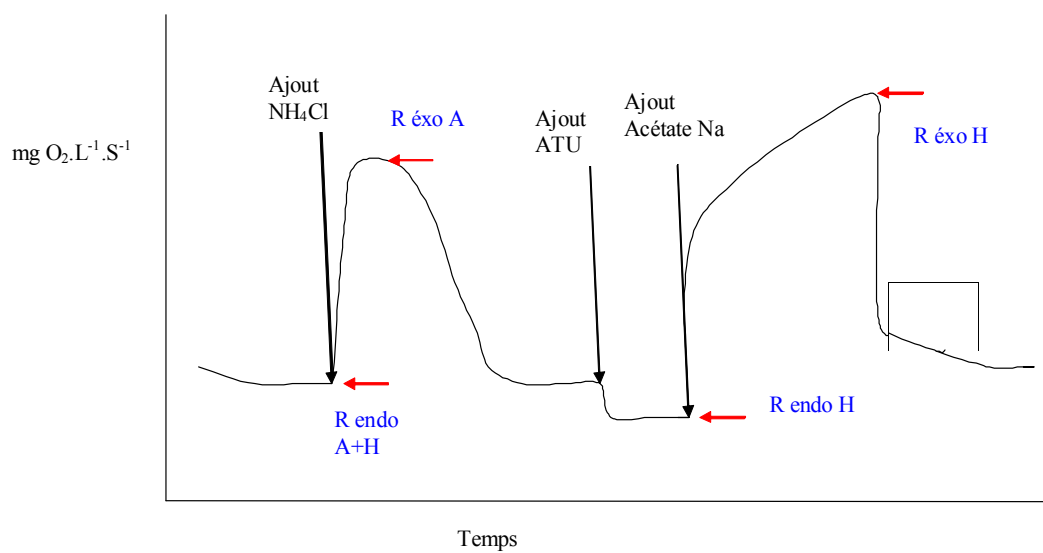


Figure 2.6.2.1(b). Exemple de respirogramme. Campagne expérimentale II. R : Respiration. Exo : exogène. A : Autotrophes. H : Hétérotrophes.

2.7 Test d'adsorption du cyclophosphamide sur la boue du bioréacteur à membrane.

Indépendamment du devenir du cyclophosphamide dans la phase liquide du procédé, le bilan complet de la molécule doit faire état des phénomènes d'adsorption sur la boue activée. La méthode utilisée est détaillée ci-dessous : Elle consiste à mesurer la concentration en Cyclophosphamide résiduelle après adjonction de boues séchées exemptes de médicament dans une solution à concentration connue de CP et un temps de contact de 2 jours.

L'adsorbant

Nous avons prélevé un échantillon de boue du bioréacteur à membrane BÂM R2 Contrôle (il ne contient pas le cyclophosphamide et ses métabolites). Après centrifugation à 5000 tour/min pendant 20 min, la masse de la boue obtenue est rincée avec de l'eau distillée pour réduire la quantité de substances exopolymériques pouvant rester dans la boue recueillie. Après lavage, une nouvelle centrifugation pendant 20 min est nécessaire. La boue est ensuite séchée à 80 °C pendant 2 jours pour assurer l'élimination de l'activité et le séchage complet de la boue. Après séchage, la biomasse résultante est broyée jusqu'à obtenir environ la même taille des grains. La boue est ensuite stockée dans un récipient sec et exempt d'humidité.

Protocole

Les différentes concentrations d'équilibre de CP ont été atteintes par différentes concentrations de dopage de CP (1, 10, 20 et 50 mg / L) dans la même masse de boues (7,5 g / L). La boue, prise du BAMR2-Contrôle, a été centrifugée et lavée avec de l'eau distillée, puis séchée comme décrit au préalable. Le mélange (50 ml de solution, volume complété et dilutions faites avec de l'eau distillée) a été placé dans des flacons coniques (250 ml) agités à 250 tr / min à 25 ° C pendant 48H, pour assurer des conditions d'équilibre. Lors des expériences, les échantillons sont gardés à l'abri de la lumière. Les échantillons sont alors récoltés, centrifugés et finalement les phases liquide et solide sont récupérées. La phase liquide est envoyée à Montpellier pour les analyses de la concentration restante en CP. Nous avons aussi conservé les phases solides, mais finalement aucune analyse n'a été effectuée.

Les échantillons de contrôle sans boues ont été traités simultanément dans les mêmes conditions. Grace à ces échantillons dits « de contrôle » nous pourrions aussi évaluer la stabilité de la molécule au cours des expérimentations.

2.8 Fonctionnement des pilotes

2.8.1 Considérations générales

Pour les deux campagnes le jour zéro représente le premier jour où nous avons réalisé la première purge visant un âge de boue donné. Quinze jours au préalable, les réacteurs ont étéensemencés avec des boues de la station d'épuration de Brax, puis alimentés par l'eau résiduaire de la même station plus un appoint de Viandox ®. Pendant cette période, nous avons régulièrement mélangé les boues des deux bioréacteurs. La veille du jour zéro le mélange a été réalisé dans les mêmes proportions pour chacune des boues en essayant d'avoir une même concentration en MES résultante.

Durant la **première campagne expérimentale (âge de boues 50 jours)** trois événements remarquables ont eu lieu :

- Dès le **jour 21**, le cocktail de cyclophosphamide et ses métabolites ont été ajoutés en continu au BÀM R1 –CP.
- Le **jour 65**, nous avons décidé d'augmenter la vitesse tangentielle le long de la membrane dans les deux bioréacteurs de 4m/s à 5m/s afin de diminuer le colmatage des membranes.
- Finalement, le **jour 114**, étant donné que le colmatage dans le pilote BÀM R1 –CP restait important, nous avons changé les membranes filtrantes de deux bioréacteurs (équivalent à nettoyage chimique).

Lors de la **deuxième campagne expérimentale (âge de boues 70 jours)**, les événements remarquables ont été les suivants :

Nous avons pris soin de faire fonctionner les pilotes sur une période au moins égale à un âge de boues sans l'ajout du cocktail, d'une part afin de démontrer que les pilotes fonctionnent réellement en parallèle et d'autre part, pour permettre à la biomasse de s'adapter aux conditions opératoires imposées par le procédé, avant de lui imposer le stress supplémentaire dû à la présence des composés pharmaceutiques étudiés. Cette fois ci, la vitesse tangentielle au démarrage était de 5m/s. Cette deuxième campagne nous permettra d'évaluer l'influence de l'âge

de boue sur l'élimination des molécules cytostatiques ainsi que de confirmer les résultats obtenus lors de la première campagne.

- Dès le **jour 108**, le BÀM R1 CP a été alimenté en continu avec le cocktail contenant les composés pharmaceutiques.
- Le **jour 111**, même si les membranes n'étaient pas colmatées, nous les avons changées afin d'assurer les mêmes capacités filtrantes pour les deux pilotes.
- Le **jour 192**, nous avons décidé de diminuer la vitesse tangentielle le long de la membrane de 5 m/s à 4 m/s dans les deux pilotes pour accentuer les phénomènes de colmatage, afin d'observer des possibles modifications et des différences sur la toxicité entre le surnageant et le perméat du BÀM R1 CP.
- Le **jour 210** la vitesse tangentielle est ramenée à 5 m/s pour diminuer le colmatage et éventuellement d'évaluer l'influence du cisaillement imposé sur la boue activée. (confirmer les effets observés durant la première campagne après l'augmentation de la vitesse tangentielle le long de la membrane). Malheureusement, le temps a été trop court entre la remise de la vitesse tangentielle à 5m/s et l'arrêt des bioréacteurs pour une observation pertinente des conséquences à cet événement.

2.8.2 Les bioréacteurs à membrane fonctionnent- ils en parallèle ?

Les figures suivantes présentent l'évolution dans le temps de plusieurs paramètres (pourcentage d'élimination de la DCO, concentration en DCO dans le surnageant et dans le perméat, concentration en MES, diamètre volumétrique moyen, pression transmembranaire, concentration en polysaccharides dans le surnageant et dans le perméat, pouvoir colmatant, respiration endogène et exogène de micro-organismes hétérotrophes) caractérisant le fonctionnement des pilotes durant les premiers jours de la campagne expérimentale II (Âge de boues 70 jours) jusqu'au jour 107, avant l'ajout du cocktail de composés pharmaceutiques.

Pendant cette période, les pilotes ont fonctionné dans les mêmes conditions opératoires.

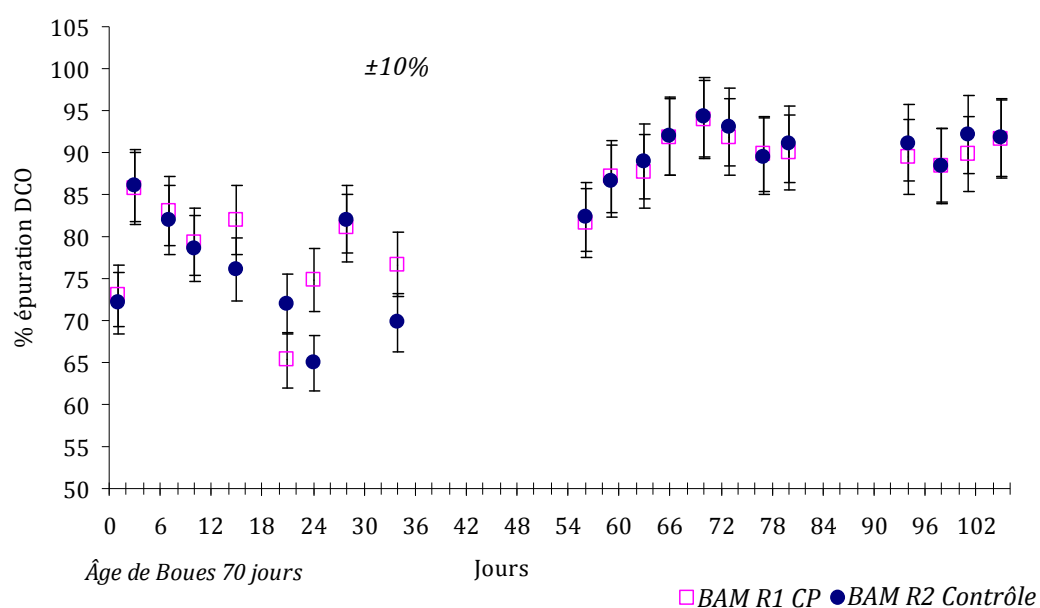


Figure 2.8.2.1 Evolution du pourcentage d'élimination de la DCO en fonction du temps pour les deux bioréacteurs. Campagne expérimentale II avant l'ajout du cocktail.

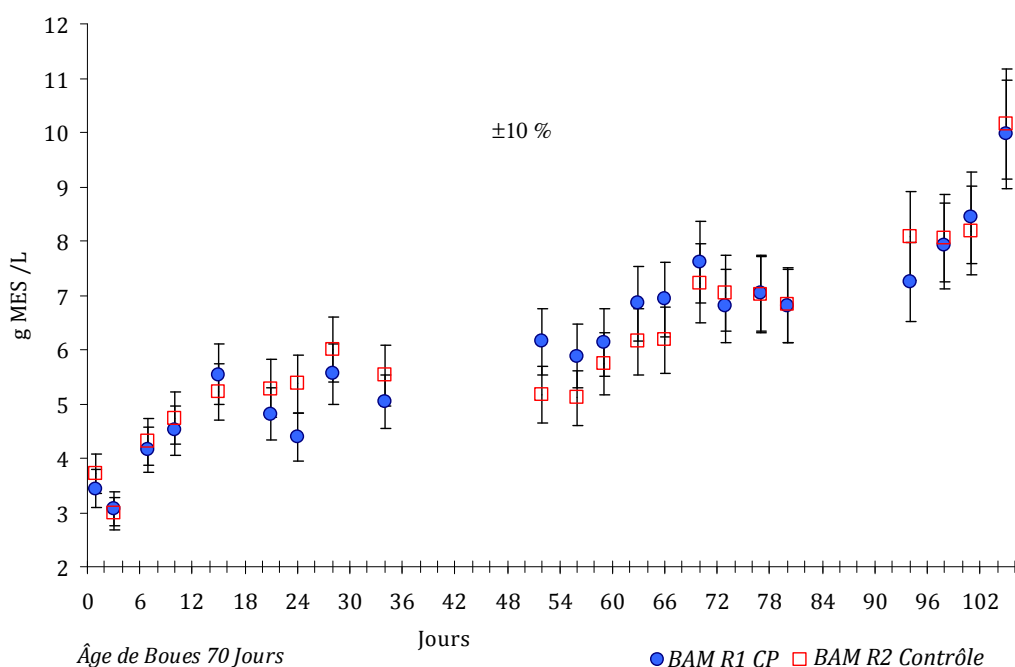


Figure 2.8.2.2 Evolution de la concentration en matière en suspension (MES) en fonction du temps pour les deux bioréacteurs. Campagne expérimentale II avant l'ajout du cocktail.

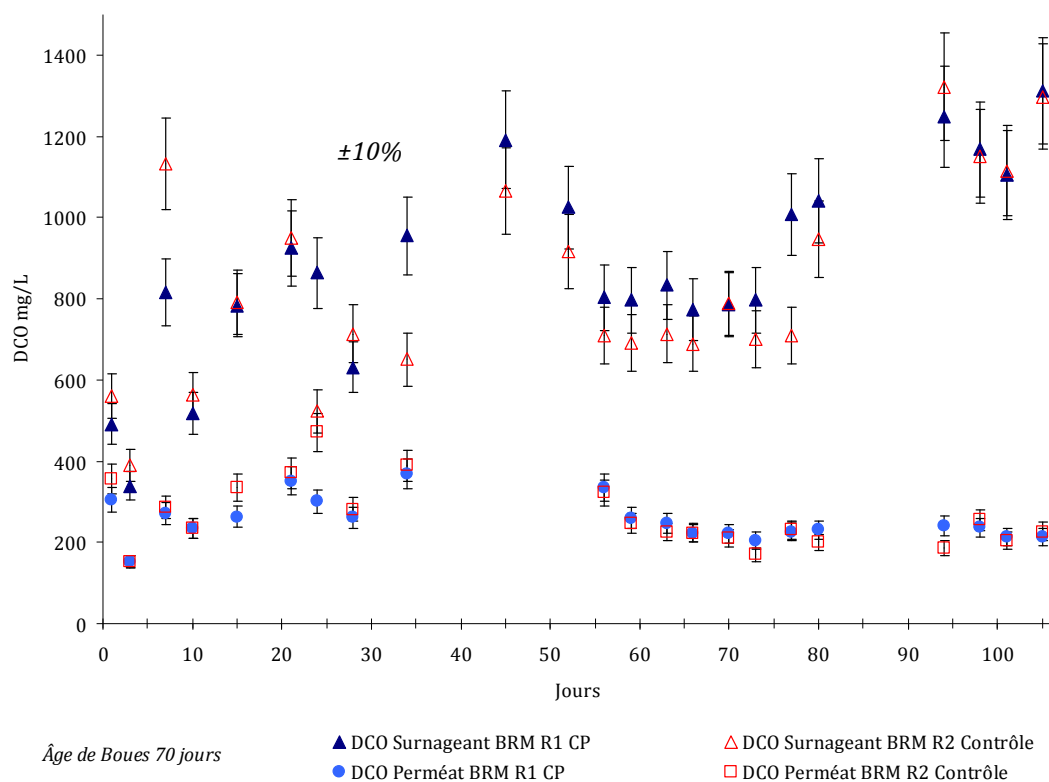


Figure 2.8.2.3 Evolution de la concentration en DCO dans le surnageant et dans le permétat en fonction du temps pour les deux bioréacteurs. Campagne expérimentale II avant l'ajout du cocktail.

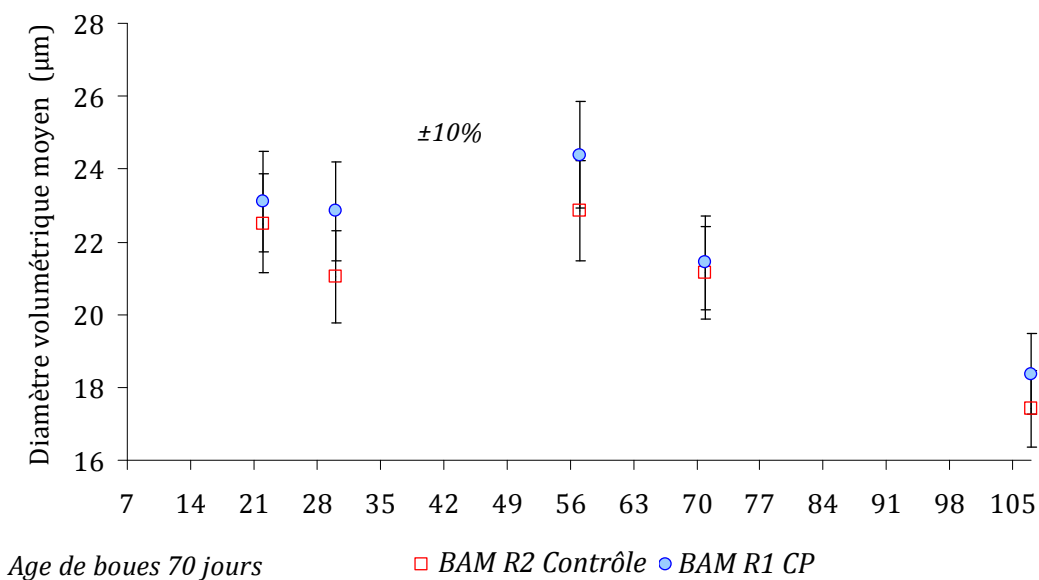


Figure 2.8.2.4 Evolution du diamètre volumétrique moyen (μm) en fonction du temps pour les deux bioréacteurs. Campagne expérimentale II avant l'ajout du cocktail.

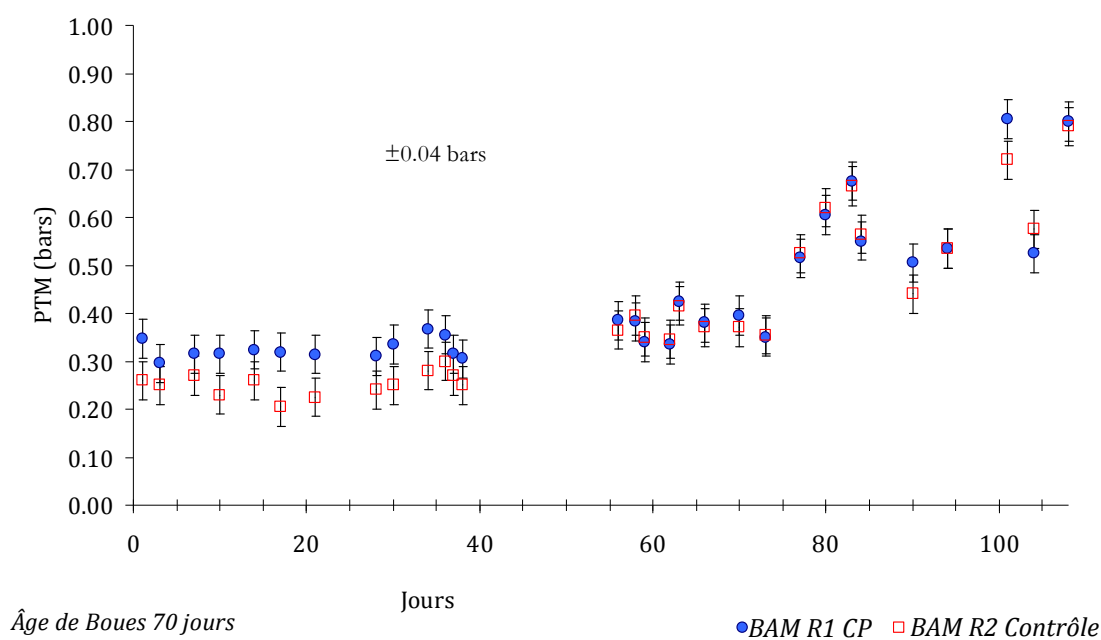


Figure 2.8.2.5 Evolution de la pression transmembranaire (PTM) en fonction du temps pour les deux bioréacteurs. Campagne expérimentale II avant l'ajout du cocktail.

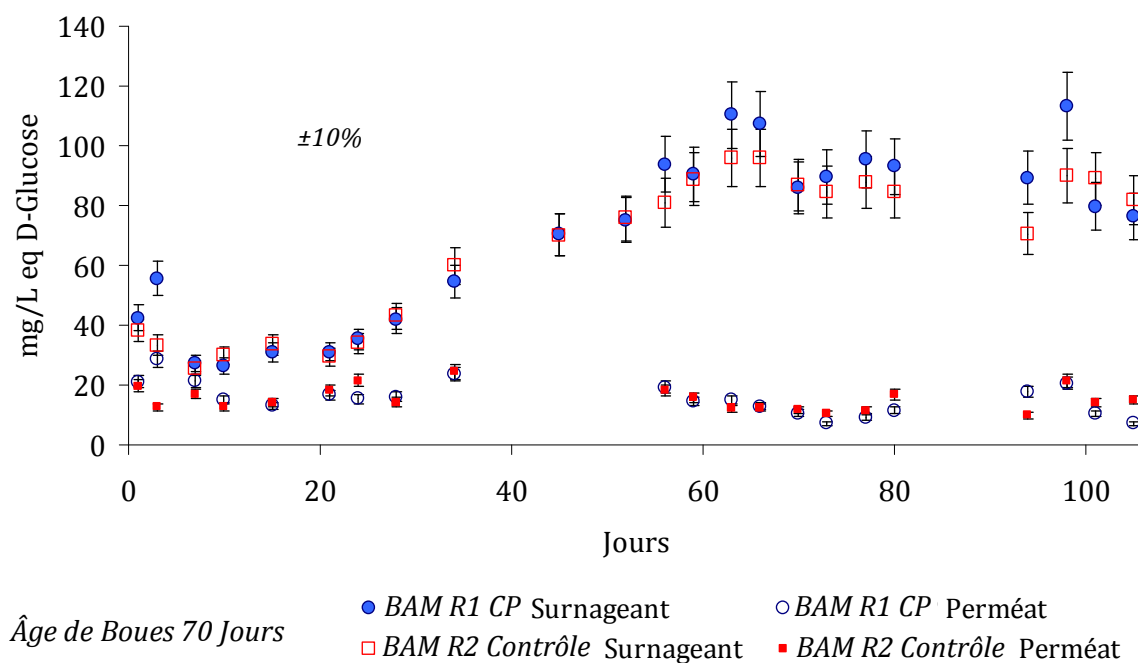


Figure 2.8.2.6 Evolution de la concentration en polysaccharides dans le surnageant et dans le permétat en fonction du temps pour les deux bioréacteurs. Campagne expérimentale II avant l'ajout du cocktail.

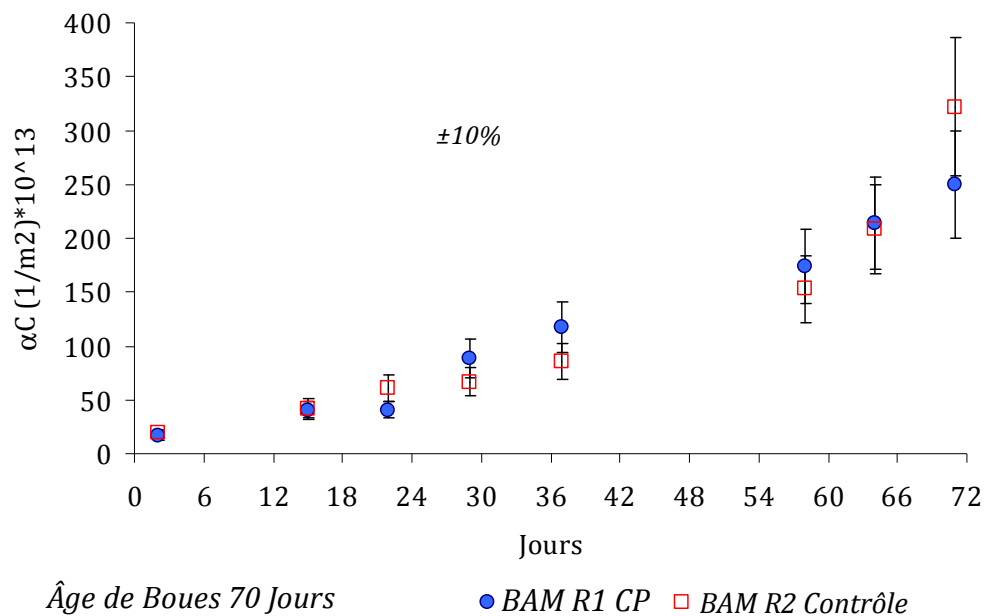


Figure 2.8.2.7 Evolution du produit αC en fonction du temps pour les deux bioréacteurs. Campagne expérimentale II avant l'ajout du cocktail.

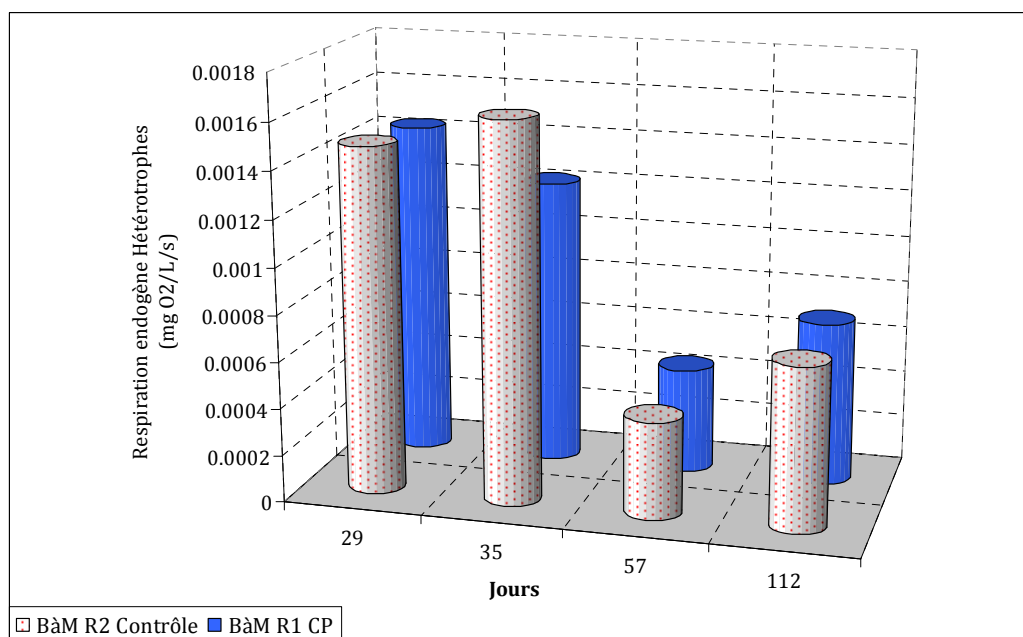


Figure 2.8.2.8 Evolution de la respiration endogène hétérotrophe en fonction du temps pour les deux bioréacteurs. Campagne expérimentale II avant l'ajout du cocktail.

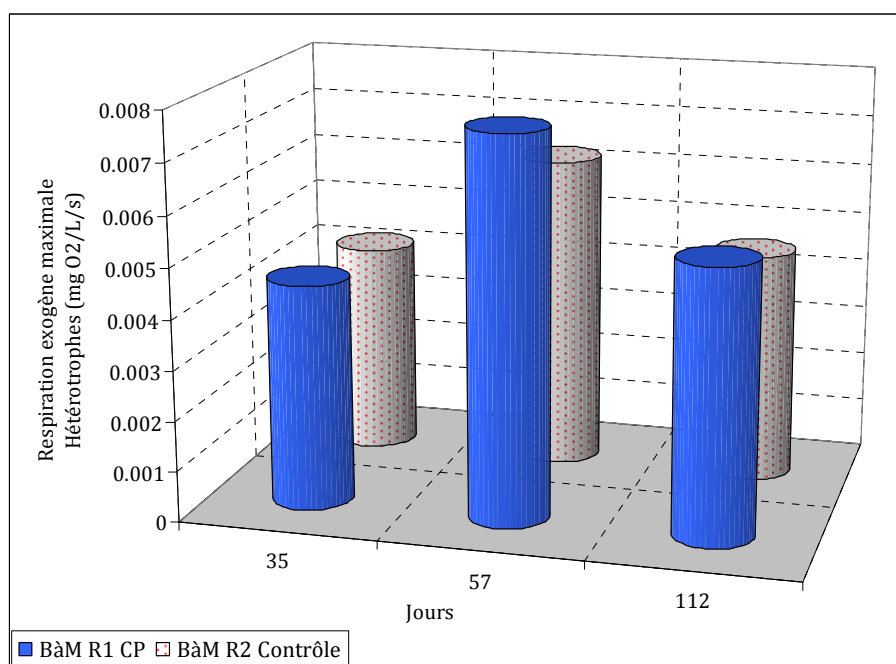


Figure 2.8.2.9 Evolution de la respiration exogène maximale hétérotrophe en fonction du temps pour les deux bioréacteurs. Campagne expérimentale II avant l'ajout du cocktail.

Pour chacune des figures nous pouvons constater que les bioréacteurs à membrane externe utilisés dans cette étude fonctionnent formellement en parallèle. Les évolutions suivent les mêmes tendances pour les deux bioréacteurs et les valeurs sont très similaires.

Chapitre III

Influence du Cyclophosphamide et ses principaux métabolites sur les performances globales du procédé et sur l'activité de la biomasse épuratrice

Ce chapitre présente les résultats des deux campagnes expérimentales visant à caractériser l'influence de la présence de Cyclophosphamide et ses principaux métabolites sur les performances du procédé. Deux âges de boues ont été évalués, 50 jours lors de la première campagne et 70 jours lors de la deuxième.

La comparaison entre les performances du bioréacteur **BÀM R1 CP** en présence de cyclophosphamide et ses principaux métabolites et les performances du Bioréacteur témoin **BÀM R2 Contrôle**, permettra d'évaluer l'influence de ces composés pharmaceutiques sur le procédé.

Les performances seront caractérisées par le suivi de la DCO dans les phases liquides du bioréacteur, à l'entrée, dans le surnageant et dans le perméat, ainsi que par l'évolution de l'azote total à la sortie des bioréacteurs et la concentration en MES au sein des pilotes. La première partie de ce chapitre présente une comparaison des performances globales d'élimination de la DCO et de l'azote total (soluble). Par la suite, une analyse des rendements de production de boues dans les deux réacteurs durant les deux campagnes est présentée.

Finalement, nous comparons les altérations sur l'activité biologique causées par le cocktail de cyclophosphamide et ses métabolites. L'activité biologique a été évaluée par l'analyse de respirométrie.

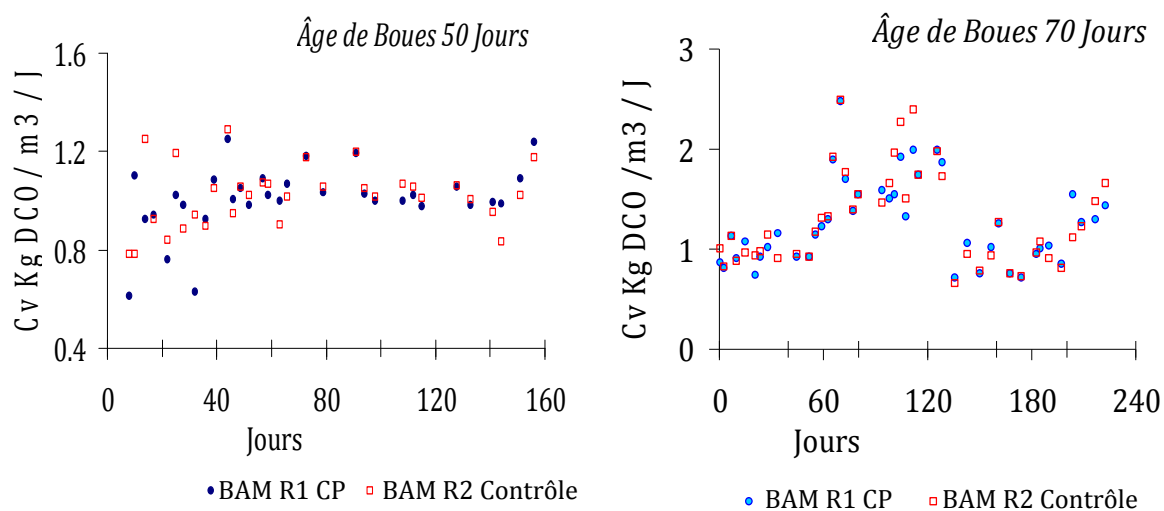
3.1. Charge volumique et concentration en DCO à l'entrée des bioréacteurs

La figure 3.1.1 montre les variations des charges volumiques dans les deux réacteurs (a) lors de la première campagne et (b) lors de la deuxième. La charge volumique appliquée (C_V) est définie selon l'équation :

$$C_V = \frac{Q_e \cdot DCO_e}{V_R}$$

Avec :

Q_e	Débit journalier d'alimentation ($L \cdot j^{-1}$)
DCO_e	DCO à l'entrée ($g \text{ DCO} \cdot L^{-1}$).
V_R	Volume de réacteur (L)



(a) Campagne I. Âge de Boues 50 jours

(b) Campagne II. Âge de Boues 70 jours

Figure 3.1.1 Variations des charges volumiques dans les deux réacteurs. (a) campagne I, (b) campagne II.

Durant les deux campagnes, l'évolution dans le temps des charges volumiques suivent des comportements similaires avec des valeurs très semblables. Pendant la première campagne, les valeurs sont quasiment constantes autour de $1 \text{ kg DCO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$.

Lors de la deuxième campagne, en plus de tester l'influence de l'âge de boue sur l'élimination du CP, nous avons voulu nous rapprocher d'une concentration en DCO à l'entrée plus proche de celle des eaux résiduaires hospitalières (environ 600 mg DCO/L , analyses faites au laboratoire). La DCO visée à l'entrée était de 1500 mg DCO/L , au lieu de 2500 mg DCO/L utilisée lors de la première campagne. C'est pourquoi, autour du jour 130, nous avons remis la charge volumique autour de $1 \text{ kg DCO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ après la remontée observée à partir du jour 60.

La figure 3.1.2 signale les variations de la concentration à l'entrée des pilotes dans le temps (a) lors de la campagne à 50 jours d'âge de boues et (b) pendant la deuxième campagne expérimentale à 70 jours.

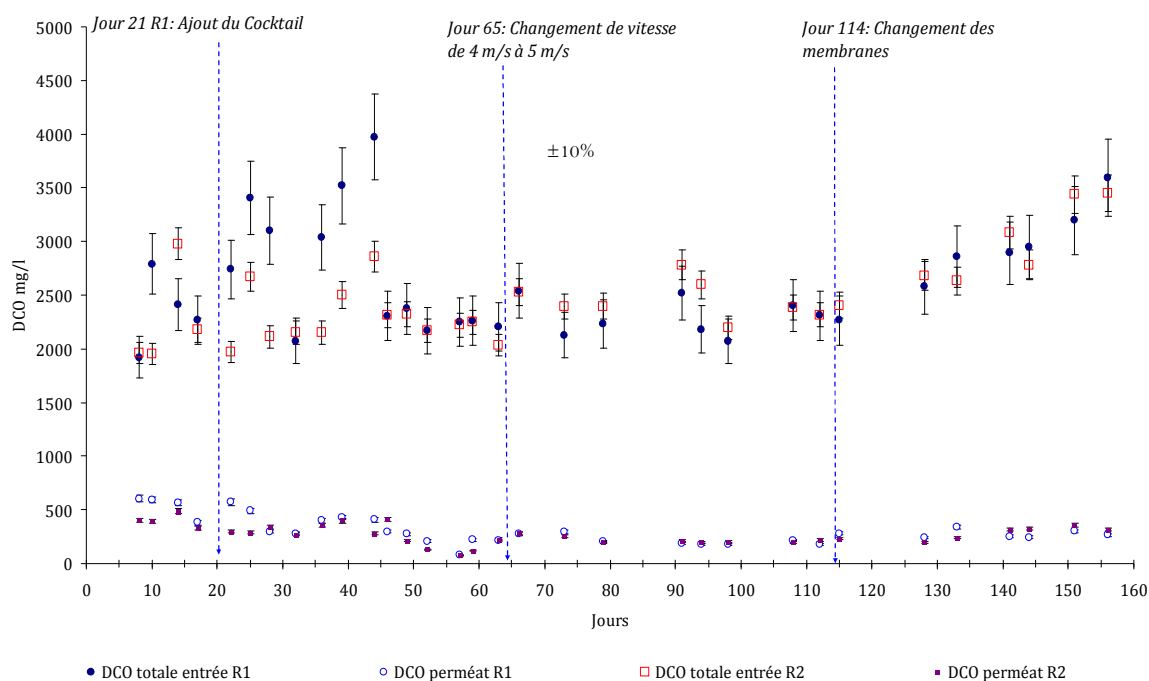


Figure 3.1.2 (a) Concentration en DCO à l'entrée et à la sortie des pilotes dans le temps.
Campagne expérimentale I. Âge de Boues 50 jours.

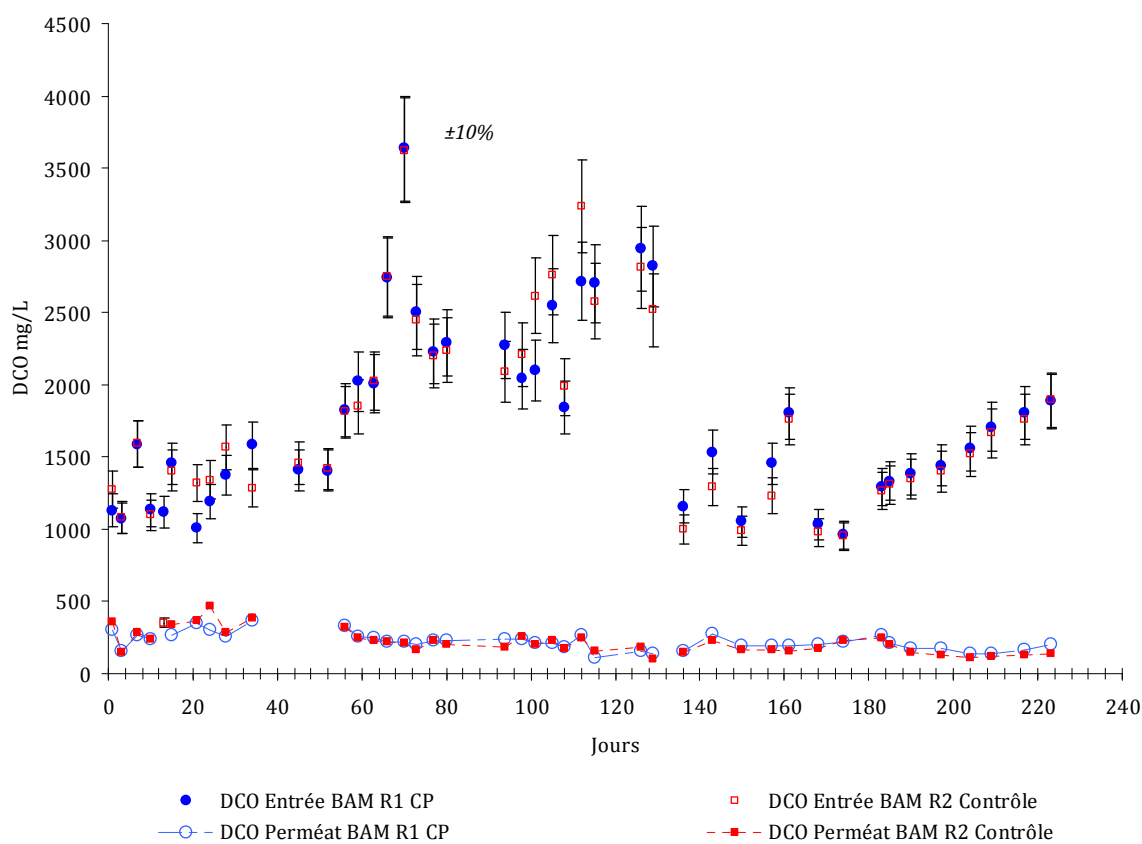


Figure 3.1.2 (b) Concentration en DCO à l'entrée et à la sortie des pilotes dans le temps.
Campagne expérimentale II. Âge de Boues 70 jours.

Concernant la campagne à 50 jours d'âge de boue, à partir du jour 45, les différences entre les concentrations à l'entrée des pilotes sont négligeables. Pour la campagne à 70 jours d'âge de boues, les concentrations en entrée ont été toujours similaires, notamment après le jour 40. Les variations sont dues à des problèmes de réglage de la pompe alimentant les BÀM en Viandox®.

Nous tenons à remarquer que malgré les variations dans la DCO à l'entrée du procédé, la DCO à la sortie des bioréacteurs est très constante et fortement similaire pour les deux pilotes durant les deux campagnes

Le tableau 3.1.1 résume les valeurs moyennes en DCO à l'entrée et de la charge volumique pour les deux bioréacteurs lors des campagnes expérimentales.

Tableau 3.1.1 Valeurs moyennes de la DCO à l'entrée et de la charge volumique imposée

	Campagne I		Campagne II	
	DCO entrée mg/L	C _v Kg DCO.m ⁻³ .j ⁻¹	DCO entrée mg/L	C _v Kg DCO.m ⁻³ .j ⁻¹
BÀM R1 CP	2610 ± 513	1.02 ± 0.12	1775 ± 630	1.26 ± 0.42
BÀM R2 Contrôle	2465 ± 392	1.03 ± 0.11	1760 ± 681	1.29 ± 0.47

La similitude observée entre les valeurs de la charge volumique et la DCO à l'entrée des pilotes nous permet d'écarter l'influence de ces paramètres sur les différences éventuelles entre bioréacteurs concernant la DCO dans le surnageant des pilotes et son pourcentage d'élimination.

3.2 Influence du Cyclophosphamide et ses principaux métabolites sur le rendement d'élimination de la DCO.

3.2.1 Âge de Boues 50 jours

L'évolution des DCO des surnageants en fonction du temps est présentée, pour les deux bioréacteurs, sur la figure 3.2.1.1. La DCO-surnageant mesurée regroupe les composés solubles et les composés colloïdaux.

L'adjonction du cocktail semble n'avoir aucune influence significative sur la DCO du surnageant durant les premiers jours d'exposition. Les différences s'affirment par contre de façon

remarquable après le changement de vitesse (Jour 65). Cette différence se creuse au fur et à mesure du temps de fonctionnement des pilotes. Une discussion plus détaillée sur l'origine de cette différence sera menée dans le chapitre IV. Cependant, nous pouvons avancer une hypothèse : les effets toxiques du CP et de ses métabolites dans l'influent pourrait avoir incité les micro-organismes à sécréter plus d'exopolymères pour leur protection. En outre, le cisaillement imposé lors du changement de vitesse entraîne une défloculation des agrégats, libérant des substances exopolymériques et des matières organiques colloïdales vers la liqueur mixte.

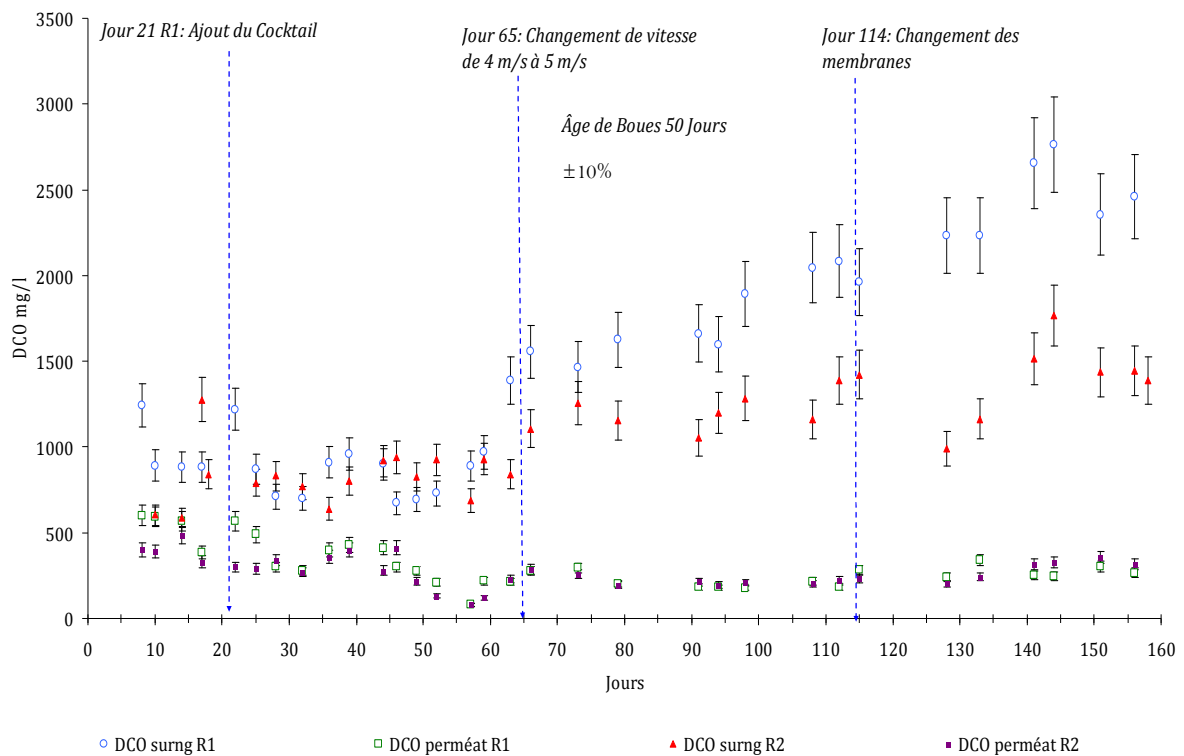


Figure 3.2.1.1 Evolution des DCO dans les surnageant des deux Bioréacteurs. Campagne expérimentale I

Bien que la DCO dans le surnageant du BÀM R1 CP soit supérieure à celle du surnageant du BÀM R2 Contrôle, les DCO dans le perméat sont très similaires. L'élimination de la DCO reste autour de 90% pour les deux bioréacteurs (Figure 3.2.1.2). Nous pouvons donc, attribuer l'élimination de la DCO à deux facteurs : la consommation par les microorganismes et la rétention par la membrane.

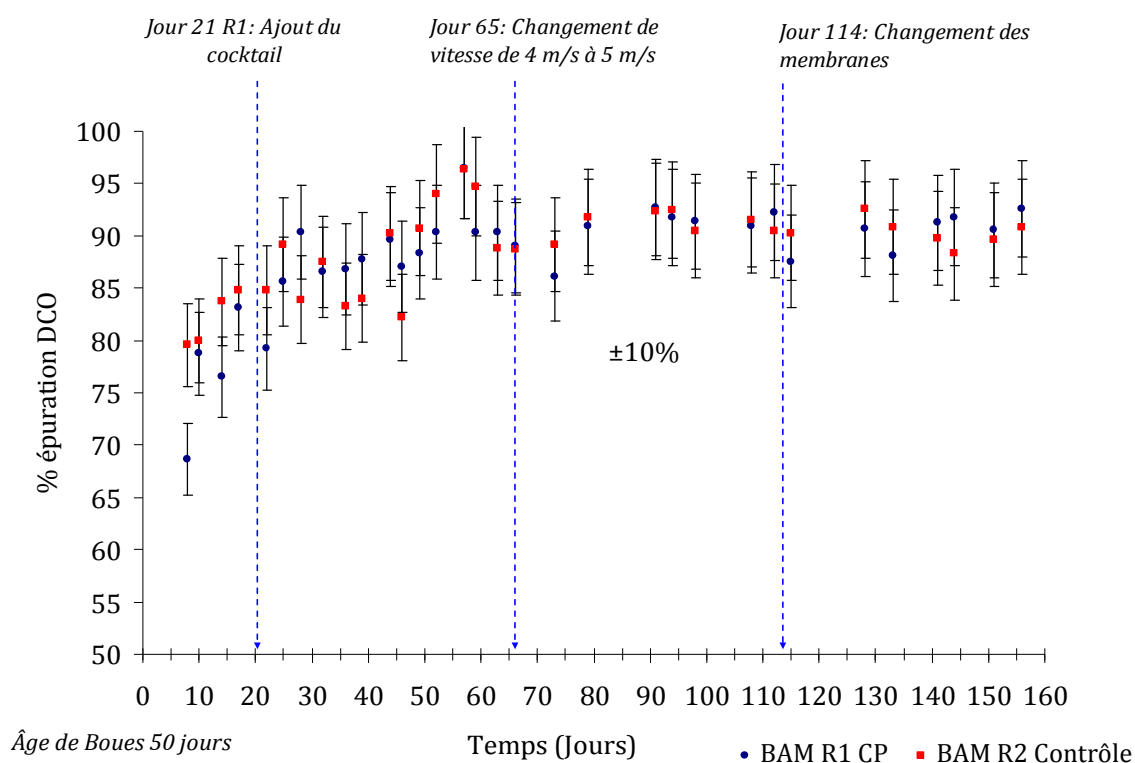


Figure 3.2.1.2 Evolution du pourcentage d'épuration de la DCO des deux Bioréacteurs.

La membrane peut aussi retenir une partie des composés solubles et colloïdaux. La figure 3.2.1.3 rapporte l'évolution des pourcentages de rétention de la DCO par la membrane, calculés selon l'équation suivante :

$$\%Rétention = \left[\frac{DCO_{Surnageant} - DCO_{perméat}}{DCO_{Surnageant}} \right] * 100 \quad \text{Eq. 3.1}$$

L'ensemble membrane et dépôt développé sur la membrane retient la majeure partie de la DCO du surnageant. Compte tenu de la concentration en DCO dans le surnageant (plus grande dans le BÀM R1-CP que dans le BÀM R2-contrôle), cette différence souligne le rôle de la membrane dans la qualité du perméat. Les différences dans le pourcentage de rétention observées entre les deux pilotes correspondent à des variations du degré de colmatage des membranes. Une discussion plus précise sera abordée dans le chapitre IV.

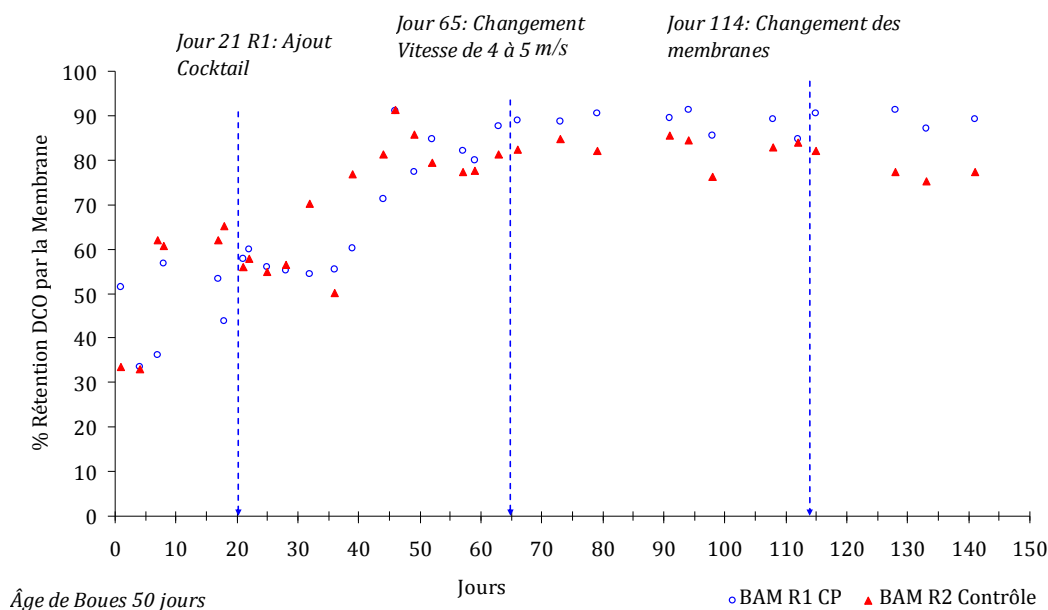


Figure 3.2.1.3 Evolution des pourcentages de rétention de la DCO par la membrane. Campagne expérimentale I.

3.2.2 Âge de Boues 70 jours

Les différences entre les concentrations en DCO dans le surnageant des BÂM sont moins évidentes lors de cette campagne comme le signale la figure 3.2.2.1. La diminution observée le jour 111 après le changement des membranes correspond à une légère augmentation de la DCO dans le perméat des réacteurs, correspondant aussi à une légère diminution du pourcentage de rétention de la DCO par la membrane (Figure 3.2.2.2). Pendant les jours 192, 210, les phénomènes de colmatage ont été accentués après la diminution de la vitesse tangentielle. Lors de cette période, la rétention par la membrane de la DCO augmente considérablement de 75% à 90% comme le montre la figure 3.2.2.2.

Suite à la re-augmentation de la vitesse tangentielle à 5 m/s, la DCO dans le surnageant du BÂM R2 Contrôle tend à retrouver des valeurs proches de celles mesurées avant la diminution de la vitesse à 4m/s. Une tendance opposée est observée dans le surnageant du BÂM R1 CP, où la DCO tend vers des valeurs supérieures à 1000 mg DCO/L, alors que avant le jour 192, la concentration en DCO était autour de 600 mg/L. Nous ne pouvons indiquer ici qu'une tendance car le temps a été trop court après la remise de la vitesse tangentielle à sa valeur initiale pour évaluer plus précisément les conséquences de cette augmentation du cisaillement sur la liqueur mixte.

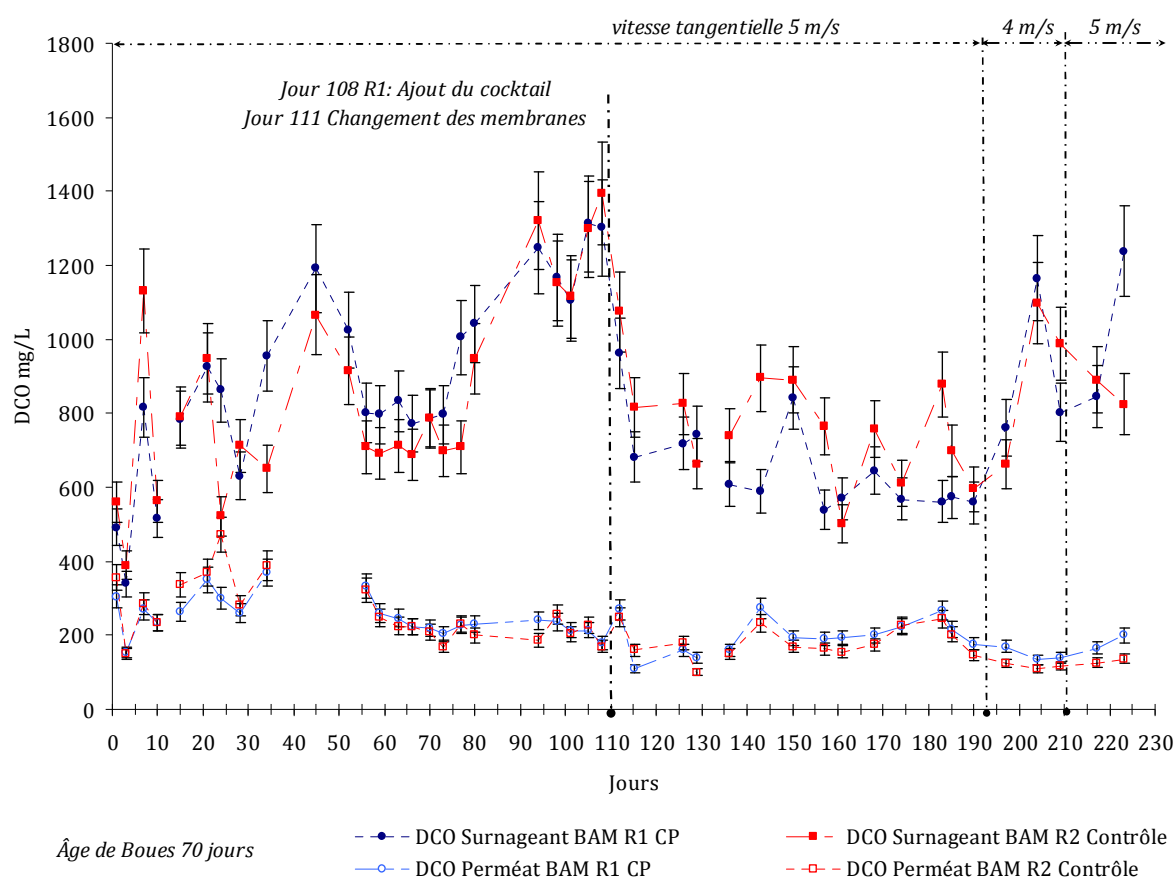


Figure 3.2.2.1 Evolution des DCO dans les surnageant des deux Bioréacteurs. Campagne expérimental II.

La figure 3.2.2.3 montre l'évolution du pourcentage d'épuration de la DCO des deux bioréacteurs lors de la campagne expérimentale II. Les fluctuations au cours de cette campagne sont beaucoup plus remarquables que celles de la campagne précédente. Les diminutions dans le pourcentage d'élimination de la DCO correspondent à des pertes de capacité de rétention par la membrane (v.f. Figure 3.2.2.2). Cependant, les pourcentages d'élimination de la DCO restent très similaires pour les deux bioréacteurs.

Au final de la campagne, le pourcentage d'élimination de la DCO reste autour de 90% pour les deux bioréacteurs.

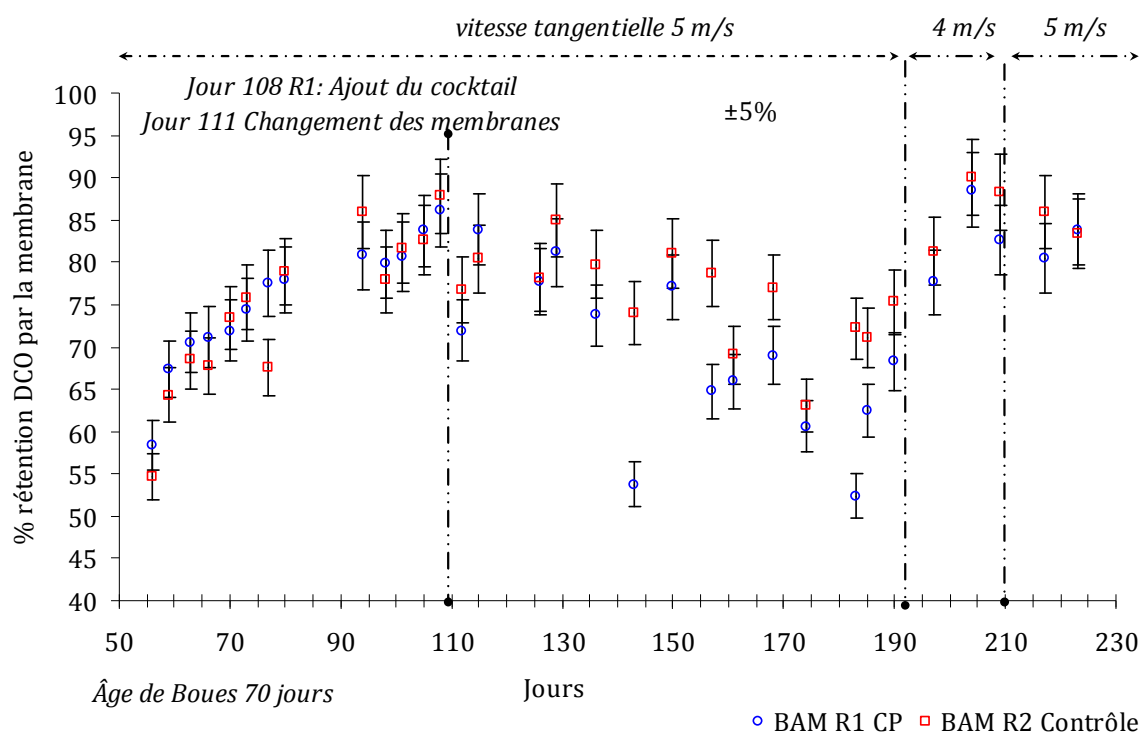


Figure 3.2.2.2 Pourcentage de rétention de la DCO par la membrane dans le temps.
Campagne expérimental II.

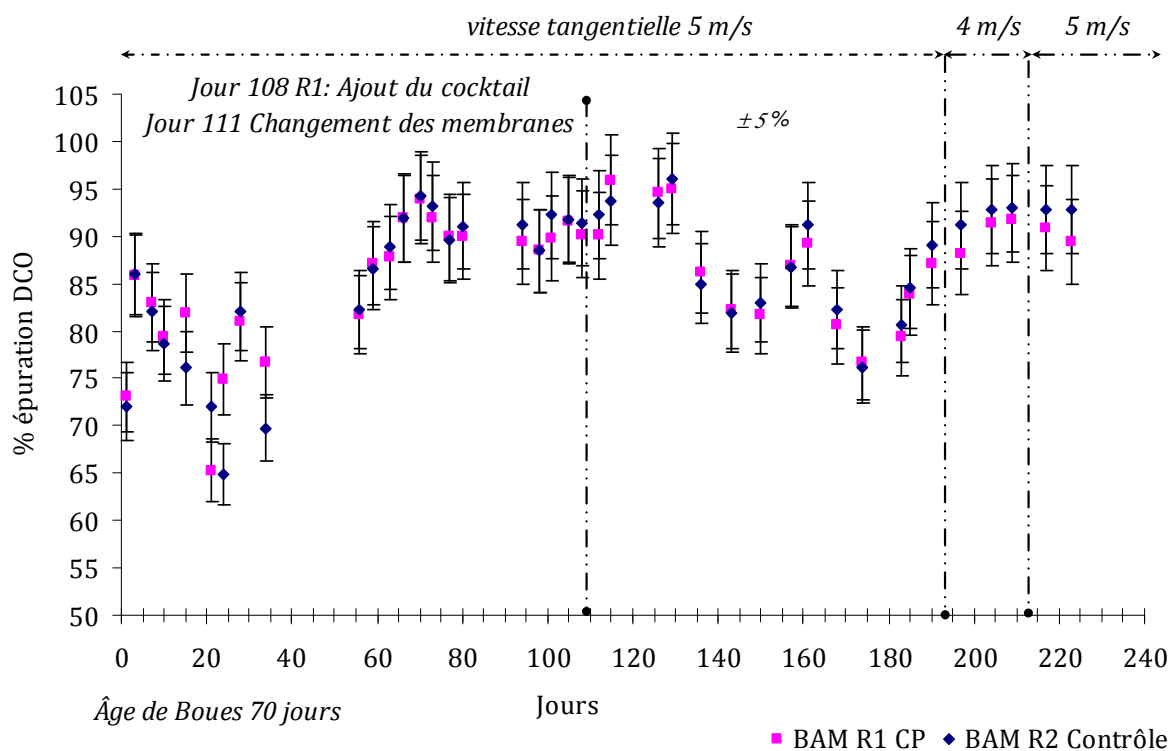


Figure 3.2.2.3 Evolution du pourcentage d'épuration de la DCO des deux Bioréacteurs.
Campagne expérimentale II.

3.2.3 Discussion (DCO)

Les résultats sur l'évolution de la concentration en DCO montrent que :

- Bien que des modifications sur la liqueur mixte soient observées (augmentation de la DCO surnageant après changement de vitesse tangentielle) les performances globales d'élimination de la DCO restent égales pour le BÀM R1 CP en présence de composés pharmaceutiques et BÀM R2 contrôle.
- L'observation précédente démontre que l'ensemble membrane - dépôt retient la majeure partie de la DCO du surnageant. Le rôle de la membrane dans la qualité du perméat est mis en évidence, surtout dans le bioréacteur BÀM R1 CP exposé aux composés pharmaceutiques étudiés, où la DCO du surnageant est la plus élevée.
- En plus de la robustesse apportée par la rétention membranaire, les concentrations élevées en MES atteintes durant les deux campagnes expérimentales (cf. 3.4 dans ce même chapitre) apporteraient aussi un élément de plus dans la robustesse du procédé bioréacteur à membrane concernant l'élimination de la DCO, y compris en présence de composés pharmaceutiques aux effets toxiques.

3.3 Influence du Cyclophosphamide et ses principaux métabolites sur l'élimination de l'azote total.

Nous rappelons que le dosage de l'azote total a été réalisé périodiquement à l'entrée et à la sortie du procédé après filtration à 0.45µm de l'échantillon. Pour les deux campagnes expérimentales l'azote total en entrée correspond au mélange de l'eau résiduaire de la station d'épuration de Brax et d'un apport en continu de Viandox ®. Un bilan de matière nous permet de calculer la concentration à l'entrée en azote total après filtration à 0,45µm pour chaque bioréacteur (Cf Chapitre II).

Les figures 3.3.1 et 3.3.2 montrent l'évolution de l'azote total dans le temps lors de la campagne I et la campagne II respectivement.

Concernant la campagne à un âge de boues de 50 jours, plus de 70 jours (1.4 fois l'âge de boues) ont été nécessaires pour que les concentrations en sortie des réacteurs deviennent stables et similaires pour les deux bioréacteurs (figure 3.3.1).

Lors de la campagne à un âge de boues de 70 jours, 105 jours (1.5 fois l'âge de boues) ont été nécessaires pour arriver à ce même constat (figure 3.3.2). Après cette période de stabilisation, les performances des deux bioréacteurs par rapport à l'élimination de l'azote total sont très semblables, comme nous pouvons l'observer sur les figures 3.3.3 a et 3.3.3 b. Pour l'une et l'autre campagne, la comparaison n'est menée qu'à partir de la stabilisation.

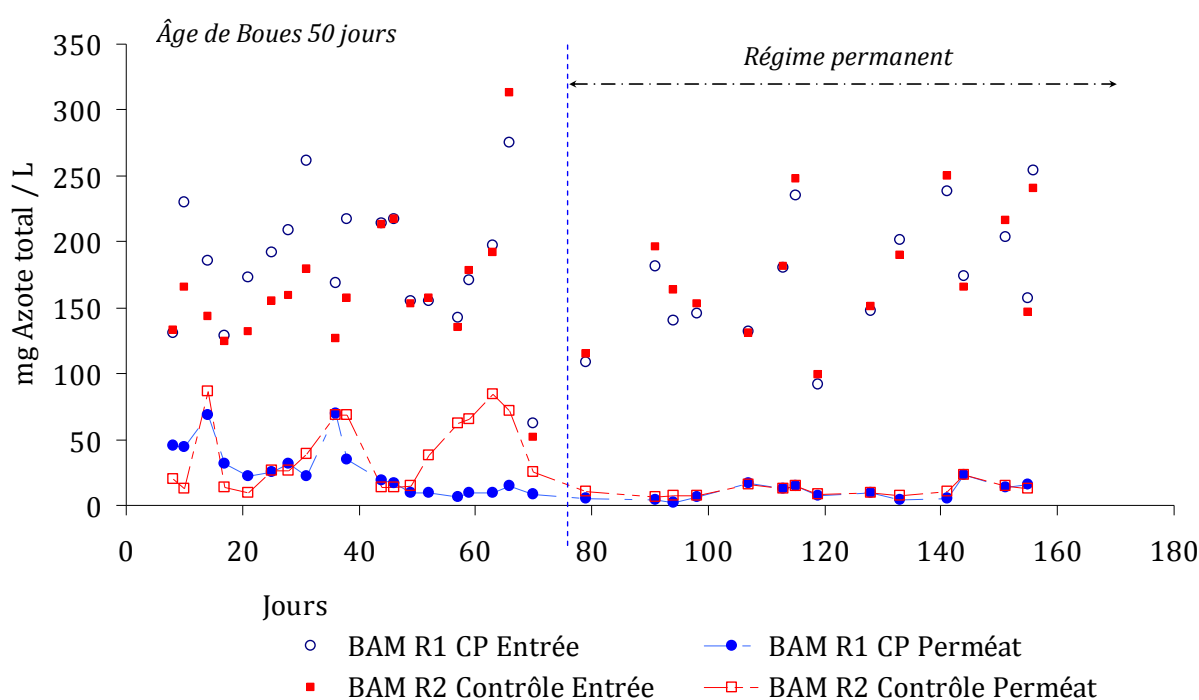


Figure 3.3.1 Evolution de l'azote total à l'entrée et à la sortie des deux Bioréacteurs. Campagne expérimental I.

Durant les deux campagnes, les pourcentages d'élimination sont élevés avec des valeurs supérieures à 90% sauf quelques exceptions. Des différences importantes sont observées lors de la deuxième campagne expérimentale (âge de boues 70 jours) après la remise de la vitesse tangentielle à 5 m/s. Dans les deux bioréacteurs, l'augmentation du cisaillement induit une diminution du pourcentage d'élimination en azote total. Cette diminution est plus marquée pour le Bioréacteur BÀM R1 CP où le pourcentage diminue jusqu'à 25% d'élimination.

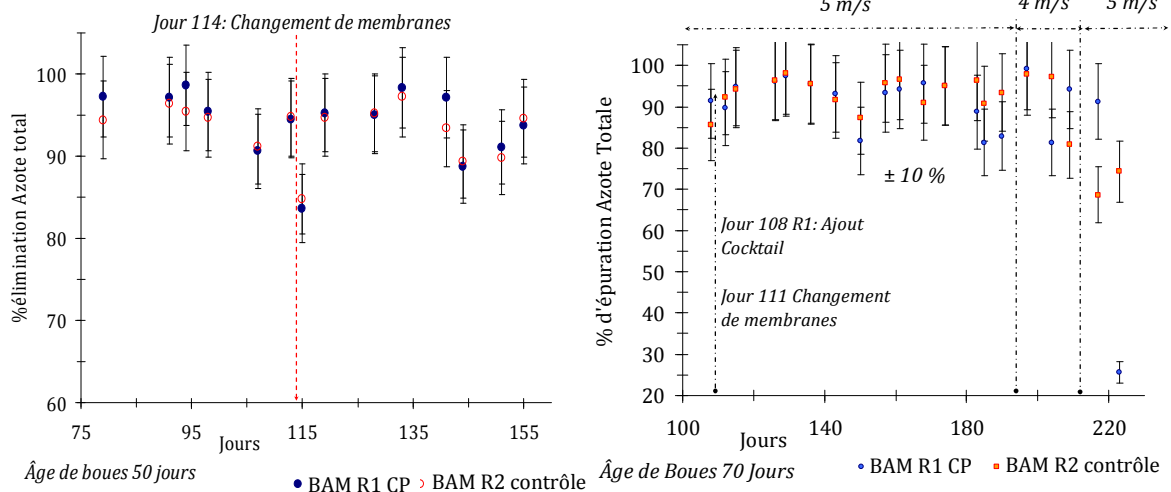
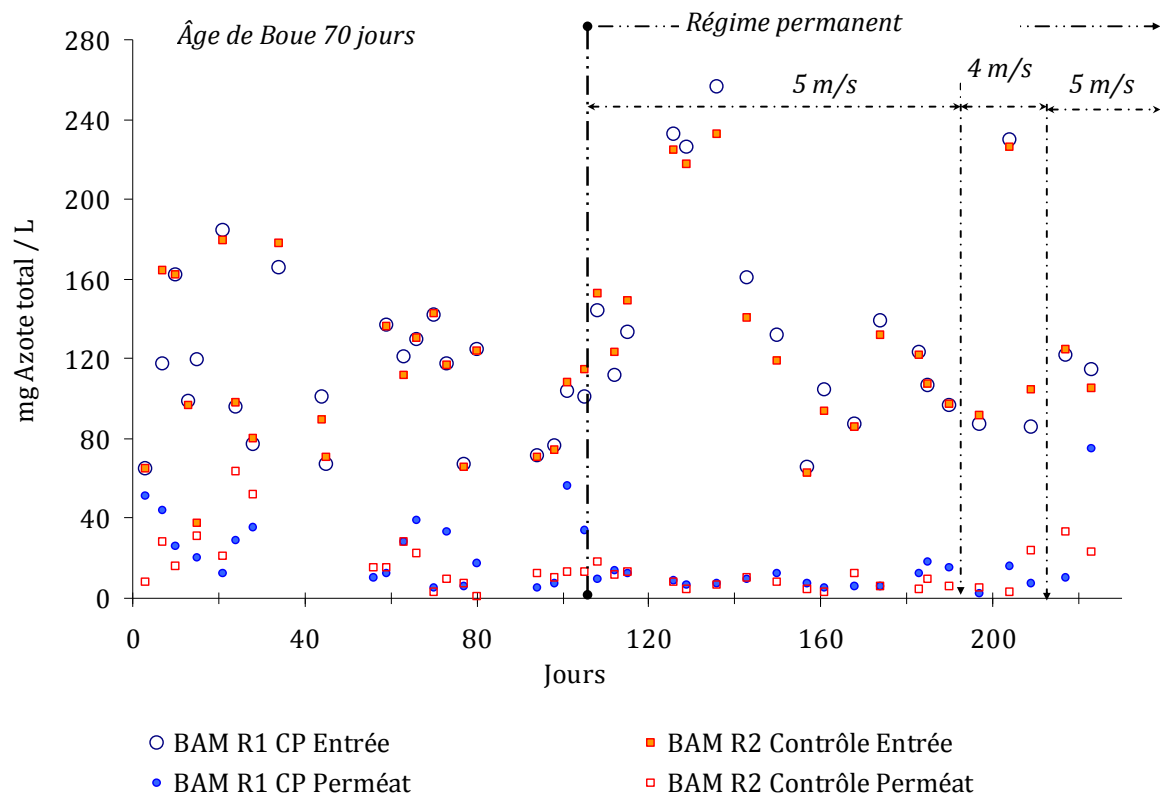


Figure 3.3.3 Evolution du pourcentage d'élimination de l'azote total des deux Bioréacteurs (a) Âge de boues 50 jours (b) Âge de Boues 70 jours.

3.3.1 Discussion (Azote)

Les performances globales d'élimination de l'azote total sont très similaires et élevées pour les deux bioréacteurs durant les deux campagnes expérimentales. Nous pouvons donc conclure que le cocktail de Cyclophosphamide et ces métabolites aux conditions opératoires étudiées n'a pas d'influence significative sur l'élimination de l'azote total. Nous supposons que la robustesse du procédé est liée aux âges de boues élevés, paramètres à l'étude dans ce travail..

En effet, il est communément admis que des âges de boues élevés favorisent la colonisation de bactéries à faible taux de croissance au sein du bioréacteur. Le temps de rétention de boues ou âge de boues, indique le temps de séjour moyen des micro-organismes dans le réacteur. Dans un système avec recyclage de la biomasse l'âge de boues correspond approximativement à l'inverse du taux de croissance. Seuls les microorganismes pouvant se développer pendant ce temps pourront être retenus dans le bioréacteur (Clara M. et al., 2005).

Les bactéries nitrifiantes (autotrophes) responsables de la nitrification de l'azote ammoniacal ont un taux de croissance très faible (de l'ordre de 0.2 à 1 j^{-1} ; Henze et al., 1987). Les conditions (50 jours et 70 jours d'âge de boues) sont donc très favorables pour le développement de ce groupe de microorganismes.

Ainsi, il semble que notre cas d'étude s'apparente à celui de Diosini et al., (2007). Ils suggèrent qu'en présence d'une inhibition importante due à des mélanges de micropolluants, on peut s'attendre à ce que des procédés de boues activées fonctionnant à de très hauts âges de boues, permettent une amélioration significative de l'élimination de l'azote. En outre, Kargi et al., (2005) montrent que lorsque le 4-chlorophénol est la seule substance inhibitrice, une amélioration de la nitrification est observée lorsque l'âge de boues est passé de 5 à 25 jours .

D'autre part, la diminution du pourcentage d'élimination de l'azote après le changement de vitesse lors de la campagne à un âge de boues de 70 jours, montre que les microorganismes jouant un rôle sur l'élimination de l'azote sont plus sensibles aux contraintes de cisaillement. Encore une fois, les effets sont plus remarquables sur le bioréacteur en présence de cyclophosphamide et ses principaux métabolites que sur le bioréacteur témoin.

3.4 Evolution des matières en suspension (MES) et du rendement de production de boues.

L'évolution des MES des deux bioréacteurs est reportée dans la figure 3.4.1.1 pour la campagne expérimentale I. Après l'adjonction du cocktail, les concentrations en MES pour les deux bioréacteurs augmentent au cours du temps, par contre des concentrations en MES légèrement inférieures sont observées dans les BÀM R1 CP du jour 40 au jour 55. Cette dissemblance s'accroît après le changement de vitesse. A la fin de la campagne expérimentale, la concentration en MES dans le BÀM R1 CP est de 8.73 ± 0.16 g MES/L et dans le BÀM R2 Contrôle est de 10.83 ± 0.18 g MES/L.

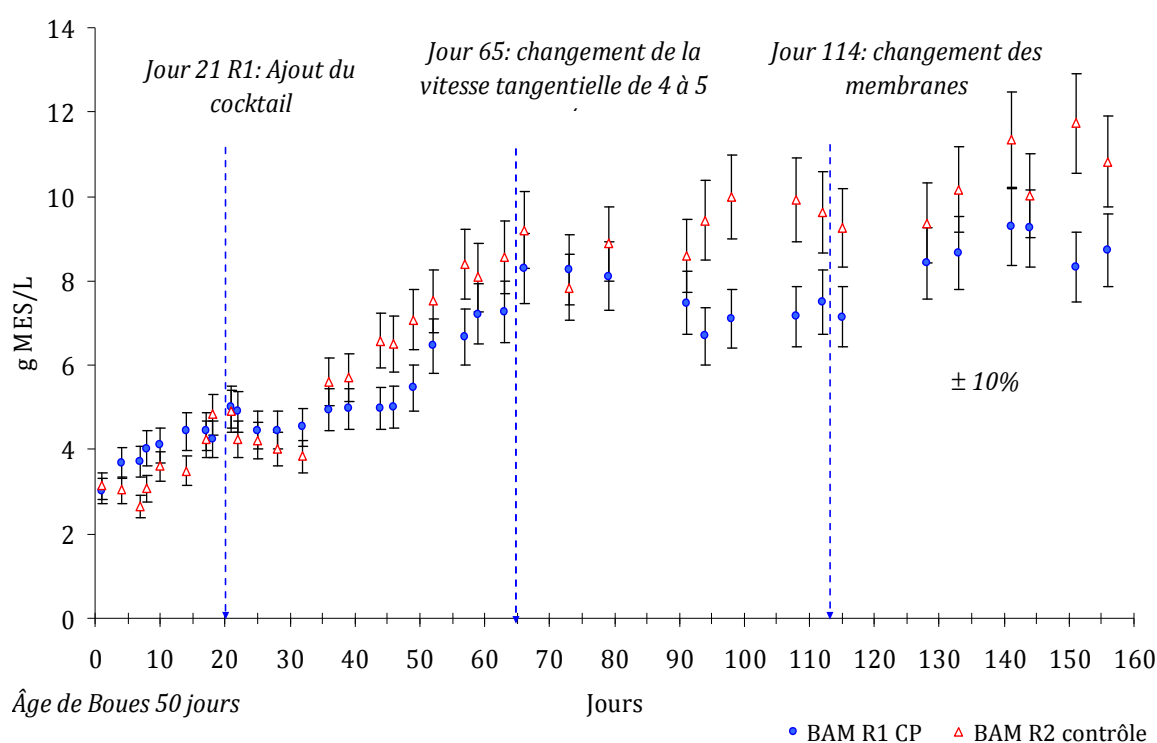


Figure 3.4.1.1 Evolution des matières en suspensions dans les deux BÀM. Campagne expérimentale I.
âge de boues 50 jours

Ce même phénomène est observé aussi lors de la deuxième campagne expérimentale (figure 3.4.1.2), confirmant l'effet du cocktail sur la concentration en matière en suspension. Du jour 126 au jour 190 des concentrations en MES dans le bioréacteur BÀM R1 CP sont légèrement inférieures par rapport au BÀM R2 Contrôle. La différence est remarquable le jour 157 où la concentration en MES dans le BÀM R1 CP est de 8.45 ± 0.043 g/L tandis que dans le BÀM R2 contrôle est de 10.65 ± 0.127 g/L.

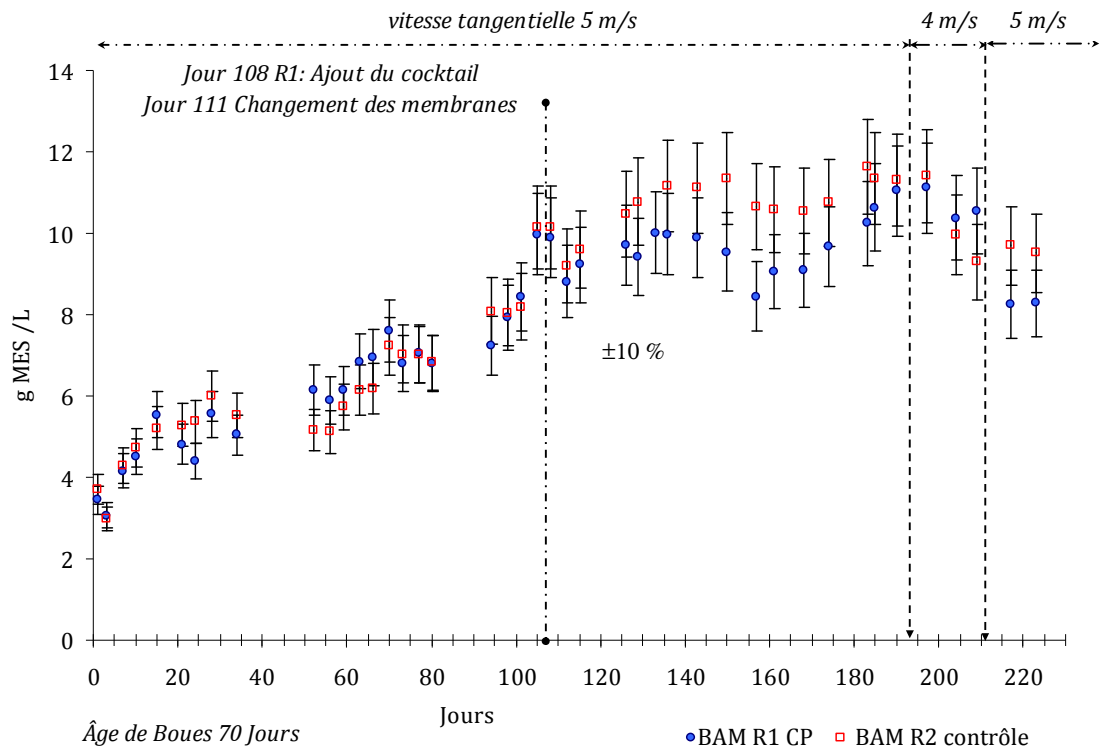


Figure 3.4.1.2 Evolution des matières en suspensions dans les deux BÂM. Campagne expérimentale II. Âge de boues 70 jours.

Les effets sont plus évidents en comparant les productions des boues cumulée. La production de boues (P_x) est déterminée par un bilan tenant compte la quantité des boues extraites du procédé. La production journalière de boues est donnée par l'équation 3.4.1.1. Les valeurs de P_x permettent de calculer la production cumulée de boue selon l'équation 3.4.1.2.

$$P_x = Q_p \cdot \text{MES}_R \quad \text{eq 4.4.1.1} \quad P_{x \text{ cumulée}} = \sum_{\text{jour}=1}^i P_x \cdot \Delta t \quad \text{eq 4.4.1.2}$$

Avec :

P_x	Production journalière de boues ($\text{g} \cdot \text{j}^{-1}$)
Q_p	Débit de purge ($\text{L} \cdot \text{j}^{-1}$)
MES_R	Matières en suspension au sein du réacteur ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
V_R	Volume de réacteur (L)
ΔMES_R	Variation de la concentration en MES au sein du réacteur ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
t	temps (j)

Nous présentons ici la production de boues cumulée de la campagne à âge de boues 50 jours (Figure 3.4.1.3), la tendance étant la même pour la deuxième campagne. L'écart s'accroît au cours de l'expérience, notamment 25 jours après le changement de vitesse.

Bien que les effets du cocktail soient à peine notables sur des paramètres macroscopiques (DCO surnageant, Azote total, MES), en regard des concentrations ajoutées en composés pharmaceutiques (de l'ordre du $\mu\text{g/L}$), les effets sont accentués par l'augmentation du taux de cisaillement sur la boue activée, lors de la première campagne expérimentale. Nous assistons donc à des phénomènes classiques de défloculation (v.f. chapitre IV) et d'augmentation de la DCO dans le surnageant caractéristiques des floccs bactériens soumis à des fortes contraintes de cisaillement. Cependant, bien que les bioréacteurs aient été soumis aux mêmes contraintes (même intensité), les différences observées entre la DCO dans le surnageant du BÀM R1 CP et celle du BÀM R2 contrôle signalent que des altérations causées par ces composés sur la matrice biologique (par exemple, surproduction de exo-polymères) sont aussi présentes.

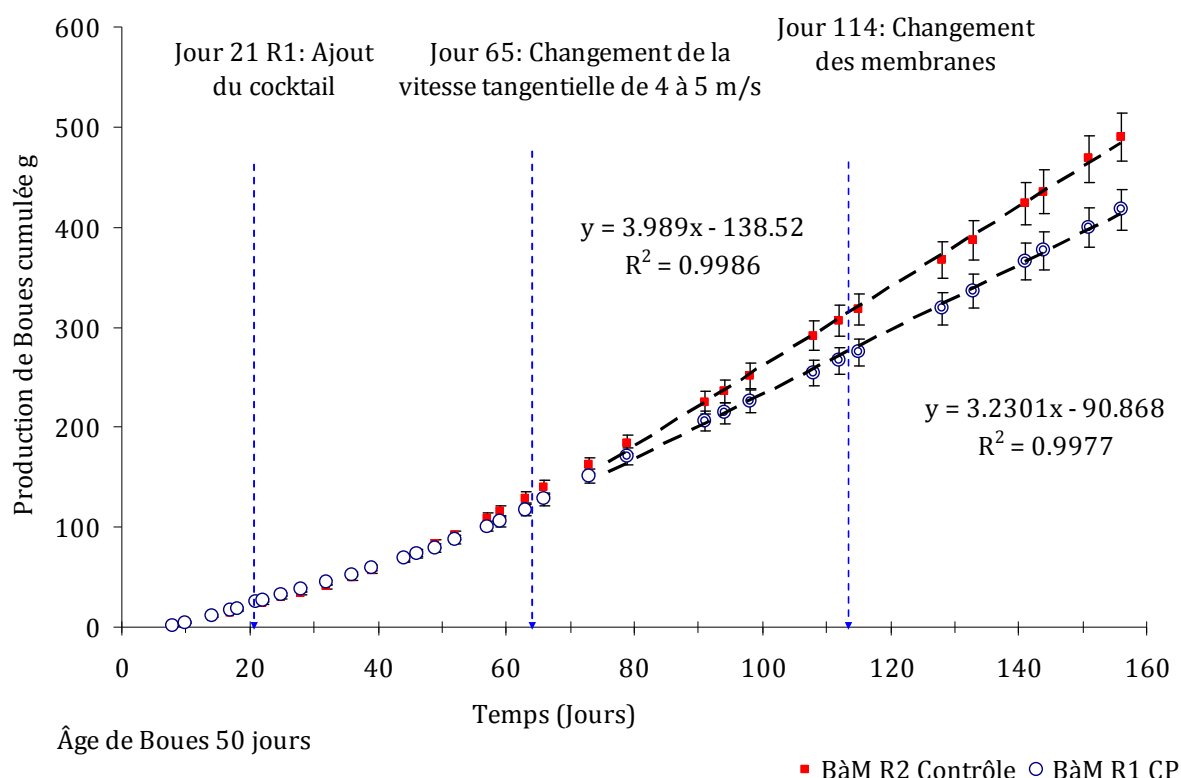


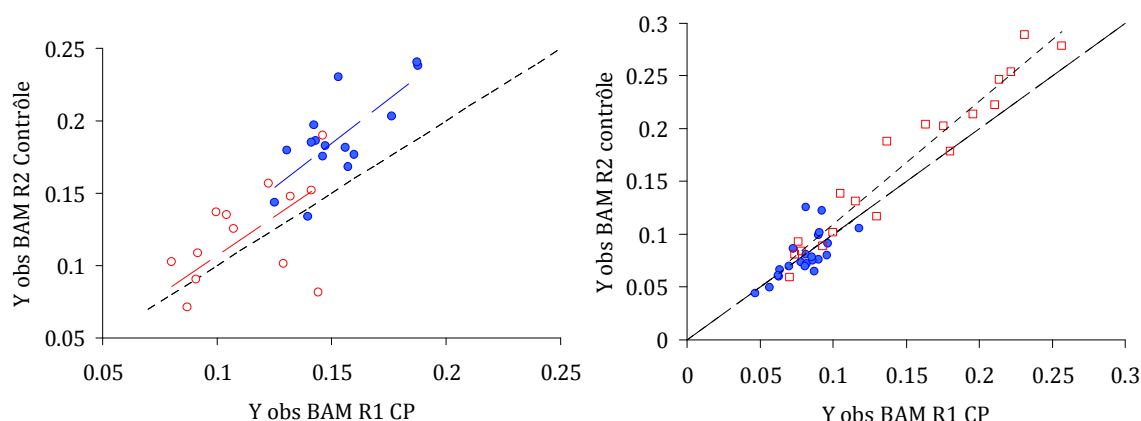
Figure 3.4.1.3 Production de boues cumulée dans les deux BÀM. Campagne expérimentale I. âge de boues 50 jours

Nous nous sommes aussi intéressés à l'évolution du rendement de production de boues sur les deux campagnes expérimentales. La figure 3.4.1.4 compare le rendement de production de boues de deux bioréacteurs calculés selon l'équation suivante, pour les deux âges de boues étudiés ((a) 50 jours, (b) 70 jours) :

$$Y_{obs} = \frac{Q_p \cdot MES}{Q \cdot (DCO_e - DCO_s)}$$

Avec :

Q_p	Débit de purge ($L.j^{-1}$)
MES	Matières en suspension au sein du réacteur ($g.L^{-1}$)
Q	Débit d'alimentation ($L.j^{-1}$)
DCO_e	DCO dans l'effluent d'alimentation ($g.L^{-1}$)
DCO_s	DCO dans le perméat ($g.L^{-1}$)



(a) Campagne expérimentale I.

- après l'addition du cocktail au BÀM R1 CP (Dès jour 21 au jour 65) et
- Après l'augmentation de la vitesse tangentielle (Dès jour 66 au jour 156)

(b) Campagne expérimentale II.

- Avant l'addition du cocktail au BÀM R1 CP (Dès jour 1 au jour 107) et
- après l'ajout du cocktail au BÀM R1 CP (Dès jour 108 au jour 223)

Figure 3.4.1.4 Rendement de production de Boues

Selon la figure 3.4.1.4a, après l'adjonction du cocktail (Cyclophosphamide et métabolites), le rendement de production de boue est légèrement supérieur dans le BÀM R2 Contrôle. Ces valeurs correspondent à 44 jours d'exposition de la boue activée à ces composés

pharmaceutiques. En outre, après avoir augmenté la vitesse tangentielle, le rendement de production de boues est beaucoup plus élevé dans BÂM R2-Contrôle que BÂM R1-CP. Cela montre qu'il y a un effet toxique du CP et ses métabolites conjugué avec le cisaillement, sur le rendement de production de boue, qui est diminué en présence des composés pharmaceutiques.

Lors de la deuxième campagne expérimentale, la boue activée a été exposée, durant une période longue, aux nouvelles conditions opératoires (107 jours), plus spécifiquement au cisaillement imposé par la pompe de recirculation (vitesse de 5m/s), avant l'ajout du cocktail. Nous nous attendons donc à que les effets observés sur le rendement de production de boues liés à la présence de composés pharmaceutiques soient plus facilement distinguables de l'effet combiné « cisaillement + toxicité de composés pharmaceutiques ».

Dans la figure 3.4.1.4b, nous observons qu'avant l'ajout du cocktail les rendements sont similaires et se placent toujours autour de la ligne bissectrice. Après l'ajout du cocktail, les rendements de production de boues sont supérieurs dans le BÂM R2 contrôle et uniquement dus à la présence des molécules cytotoxiques. De ce fait l'écart à la bissectrice (figure 3.4.1.4 (b)) est inférieur à celui observé précédemment (figure 3.4.1.4 (a)).

D'après ces résultats nous nous attendons donc à des altérations sur l'activité biologique. L'analyse de l'activité par respirométrie nous permettra d'observer les altérations causées par la toxicité du cyclophosphamide et ses principaux métabolites.

3.5 Influence du Cyclophosphamide et ses principaux métabolites sur l'activité biologique.

A présent, nous allons aborder et discuter les résultats obtenus par les analyses de respirométrie. Les résultats seront présentés en 3 parties :

- **Effet sur la activité suite à un pulse de toxiques:** dans une première partie nous avons voulu observer l'influence d'une injection (pulse) d'un mélange relativement concentré de cyclophosphamide et ses principaux métabolites sur l'activité biologique des microorganismes hétérotrophes en suivant l'évolution de l'oxygène dissous dans le respiromètre. Le temps d'exposition étant très court.

- **Effet sur l'activité biologique durant 4 jours d'exposition** : dans une seconde partie, la biomasse est restée en contact avec les composés pharmaceutiques en concentrations relativement élevées durant 4 jours. Un apport en substrat exogène carboné et azoté est fourni en continu. Nous rappelons que le temps de séjour hydraulique de l'influent est de 48h durant la première campagne expérimentale et de 32 durant la deuxième.
- **Effet des composés pharmaceutiques étudiés sur la biomasse épuratrice à long terme** : des analyses de respirométrie ont été réalisées périodiquement pour chacun des bioréacteurs durant les deux campagnes expérimentales. Une comparaison des résultats obtenus pour le réacteur BÀM R1 CP avec ceux du réacteur témoin, nous permettra d'évaluer l'influence du cyclophosphamide et ses principaux métabolites sur l'activité biologique au sein des réacteurs.

3.5.1 Effet à concentration élevée et à court temps d'exposition

Les concentrations en composés pharmaceutiques utilisées durant les deux tests de respirométrie suivant (effets à court temps d'exposition) sont consignées dans le tableau (3.5.1) ci-dessous :

Tableau 3.5.1 Concentrations en composés pharmaceutiques dans le respiromètre.
Test évaluant les effets du cocktail à court temps d'exposition.

<i>Composé</i>	<i>Concentration dans le respiromètre ($\mu\text{g/L}$)</i>
Cyclophosphamide	175.71
Acroléine	80.11
Moutarde Phosphoramide	311.67
DCCP	59.03
4-Keto CP	36.46
Moutarde Norazotée	18.23

Les concentrations utilisées sont pratiquement 35 fois plus concentrées que celles ajoutées en continu dans le pilote BÀM R1 CP durant les deux campagnes expérimentales.

3.5.1.1 Effet sur l'activité suite à une injection (pulse) de toxiques

Le test se déroule de la façon suivante : Un échantillon de boues du bioréacteur BAM R2 Contrôle est prélevé et versé dans le respiromètre (jour 80, campagne II). La concentration dans le respiromètre en MES est ajustée à 2g/L. Un apport continu en air durant plusieurs heures a permis l'épuisement du substrat exogène présent dans le surnageant. Suite à cet épuisement, les microorganismes entrent en phase de respiration endogène. Une fois cet état atteint, une quantité connue en acétate de sodium (1ml d'une solution de 230 mg Acétate/mL) est ajoutée dans le respiromètre. La vitesse de consommation en oxygène est enregistrée dans le temps. Après l'épuisement du substrat ajouté, les microorganismes se maintiennent en respiration endogène. Le cocktail est alors ajouté. Plus de 2 heures après, de nouveau, la même quantité d'acétate de sodium est ajoutée dans le respiromètre. Si un effet inhibiteur existait, la consommation d'oxygène totale pour l'assimilation de la DCO ajoutée serait inférieure à celle enregistrée après la première adjonction. La figure 3.5.1.1 montre l'évolution temporelle de la vitesse de consommation d'oxygène.

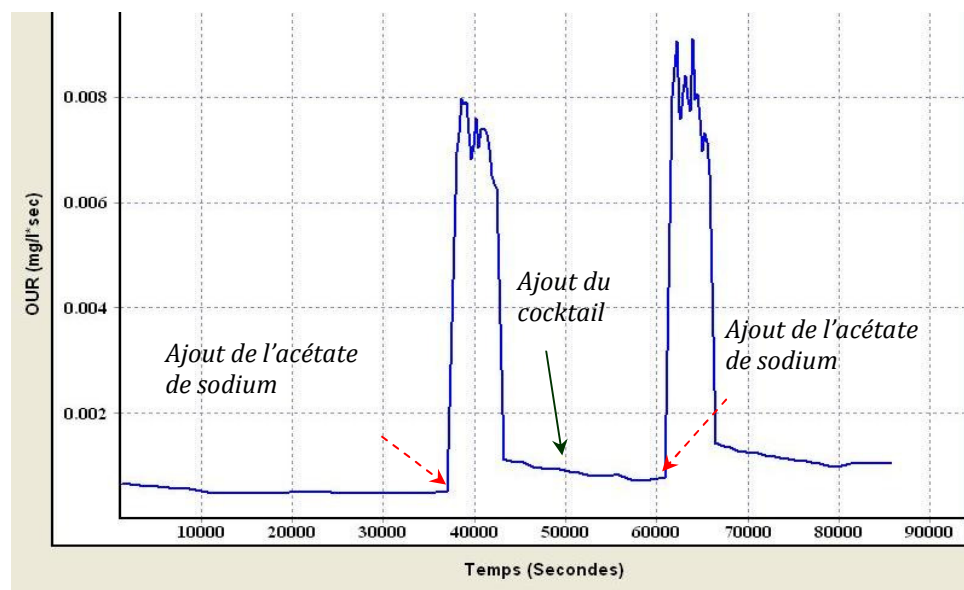


Figure 3.5.1.1 Evolution de la vitesse de consommation d'oxygène dans le temps. Test évaluant l'effet sur l'activité suite un pulse de toxiques

L'aire sous la courbe pour chacun des pics représente la quantité d'oxygène nécessaire pour l'assimilation du substrat exogène ajouté. Le tableau montre les valeurs calculées (grâce au logiciel *Respiroexpert*, développé au laboratoire):

Tableau 3.5.1.1 Consommation d'oxygène pour l'assimilation du substrat exogène ajouté.
Test évaluant l'effet sur l'activité suite un pulse de toxiques

	Consommation d'oxygène (mg O₂/L)
Avant l'ajout du cocktail	33.202 ± 0.121
Après l'ajout du cocktail	32.528 ± 0.595

Nous constatons donc que les composés pharmaceutiques, aux concentrations testées, n'ont pas d'influence immédiate sur l'activité des microorganismes hétérotrophes. D'autre part, après l'ajout du cocktail, nous n'observons pas de changement sur la respiration endogène de microorganismes.

3.5.1.2 Effet sur l'activité biologique durant 4 jours d'exposition

Durant la deuxième campagne expérimentale (âge de boues 70 jours) un échantillon de boues provenant du bioréacteur témoin BÂM R2 Contrôle est extrait le jour 136 pour l'analyse de respirométrie. L'objectif de cette expérience est d'évaluer l'influence du cocktail de composés pharmaceutiques sur l'activité de la biomasse durant 4 jours d'exposition.

La concentration en MES dans le respiromètre étant de 2 g/L dans un volume total de 1.5 L. Un mélange (300ml) de NH₄Cl (Chlorure de Ammonium) et de CH₃COONa (Acétate de Sodium) est ajouté en continu à l'aide d'une pompe d'alimentation avec un débit très faible (environ 75 ml/jour), afin d'assurer un apport exogène en substrat carboné et azoté pour les microorganismes hétérotrophes et autotrophes respectivement. Le pourcentage de variation du volume total dans le respiromètre par l'ajout du substrat exogène est de 20%. Le cocktail sera donc dilué au cours de l'expérience mais la concentration restera toujours très élevée par rapport aux concentrations additionnées dans les pilotes (De 35 à 29 fois plus concentrée).

Le cocktail est ajouté une fois que la vitesse de consommation d'oxygène dans le respiromètre arrive à une valeur à peu près constante. Si le cocktail, aux conditions étudiées, avait un effet d'inhibition sur l'activité biologique la vitesse de consommation en oxygène devrait diminuer.

Dans la Figure 3.5.1.2, nous observons le taux de consommation d'oxygène par les microorganismes en fonction du temps pendant l'addition en continu de la source d'azote (NH₄Cl) et de carbone (CH₃COONa).

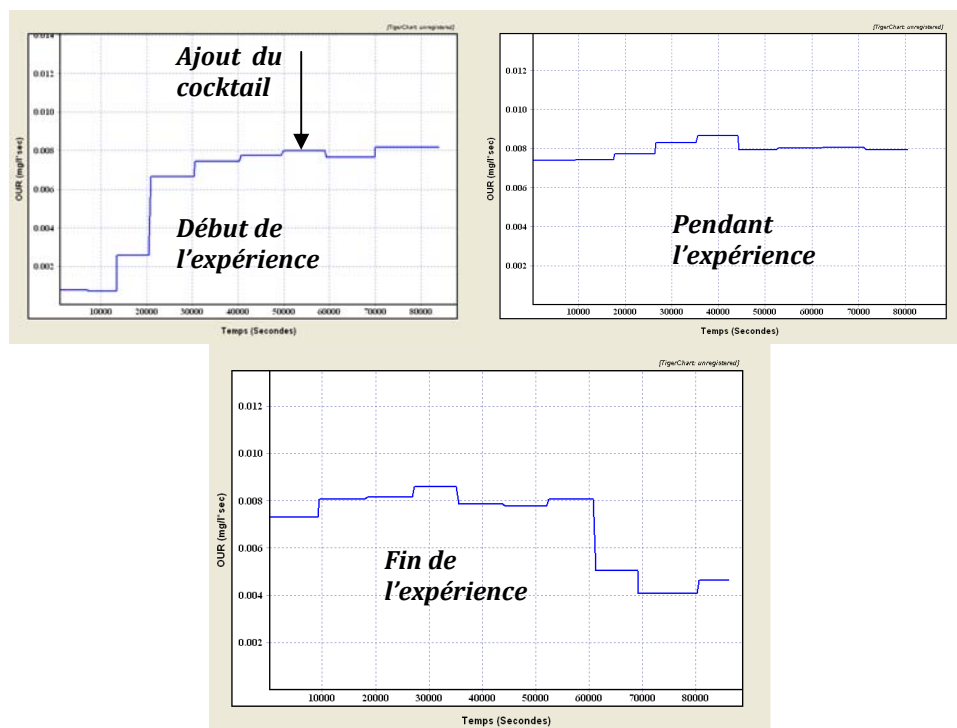


Figure 3.5.1.2 Evolution de la vitesse de consommation d'oxygène dans le temps.
Test évaluant l'effet sur l'activité biologique durant 4 jours d'exposition.

Après une phase de démarrage, l'activité microbienne se stabilise à une valeur de vitesse de consommation d'oxygène de 0.008 mgO₂/L/s. Cette valeur reste inchangée pendant toute la durée de l'expérience. A la fin du test, la diminution de l'activité est due simplement à l'épuisement du substrat exogène ajouté. Ces graphiques nous montrent qu'il n'y a pas de diminution de l'activité microbienne pendant les 4 jours qui suivent l'addition du cocktail. Ces données indiquent que l'activité microbienne n'est pas affectée par la cyclophosphamide et ses métabolites aux concentrations utilisées, sur la durée considérée. Cependant, cette expérience n'écarte pas la possibilité d'une action à plus long terme.

3.5.2 Effet des composés pharmaceutiques étudiés sur la biomasse épuratrice à long terme

Dans les procédés à boues activées, la consommation d'oxygène est directement associée à la fois à l'élimination du substrat et à la croissance de la biomasse. Par conséquent, le taux de respiration d'oxygène par unité de volume et de temps est largement reconnu comme un paramètre important pour rendre compte de la viabilité de la biomasse (Spanjers et al., 1998). L'activité des organismes hétérotrophes et des organismes nitrifiants a été régulièrement suivie par l'exécution

du test de respirométrie, en vue d'étudier la variation de leur viabilité. La vitesse de respiration endogène et la vitesse de respiration maximale exogène ont été évaluées.

Le taux de respiration endogène est défini comme le taux de consommation d'oxygène en l'absence de substrat exogène et comprend la consommation de résidus cellulaires autochtones pour la formation de biomasse (concept de mort-génération), production d'énergie de maintenance et la respiration des protozoaires (Ray et Peters, 2008).

La vitesse de respiration maximale exogène est définie comme la vitesse de consommation d'oxygène atteinte lorsque tous les substrats qui peuvent être oxydés par une population microbienne hétérogène sont présents en excès. Cette condition est peu probable, mais la respiration en présence d'un excès d'un substrat ou d'un groupe de substrats peut être mesurée (Spanjers et al., 1998).

Nous avons présenté antérieurement (chapitre II) les protocoles expérimentaux pour les tests de respirométrie pour chacune des deux campagnes. Nous tenons à rappeler que ces tests ont été réalisés de manière différente pour chacune d'elles.

Pour les tests de respirométrie de la première campagne expérimentale, le viandox ® a été utilisé comme substrat carboné, tandis que pour la deuxième campagne, l'acétate de sodium a été choisi comme substrat carboné, car il est facilement biodégradable par la plupart des populations hétérotrophes. En outre, le chlorure d'ammonium a été utilisé pour évaluer l'activité de la population nitrifiante (nitritation et nitratisation).

Durant la campagne à un âge de boues de 50 jours, les boues prélevées du bioréacteur sont directement versées dans le respiromètre sans dilution préalable. La concentration en MES dans le respiromètre est donc variable entre chaque test réalisé. Au contraire, lors de la campagne à un âge de boues de 70 jours, nous avons essayé de travailler à des concentrations égales en MES dans le respiromètre pour tous les points analysés (autour de 2 g MES/L). Le tableau suivant regroupe les conditions utilisées durant les tests de respirométrie pour chaque campagne expérimentale.

Tableau 3.5.2 Concentration en MES et quantité de substrat ajouté.
Test respirométrie durant les deux campagnes expérimentales.

Campagne I. Âge de boues 50 jours			Campagne II. Âge de boues 70 jours		
Azoté ajouté. Concentration résultante dans le respiromètre			Azoté ajouté. Concentration résultante dans le respiromètre		
13 mg/L			20 mg/L		
DCO ajoutée. Concentration résultante dans le respiromètre			DCO ajoutée. Concentration résultante dans le respiromètre		
105 mg/L			204 mg/L		
jour	BÀM R1 CP MES g/L	BÀM R2 Contrôle MES g/L	jour	BÀM R1 CP MES g/L	BÀM R2 Contrôle MES g/L
20	5.62	4.9	29	2.09	2.54
30	5.07	4.01	35	1.55	1.89
37	4.84	5.64	57	2.1	2.08
45	4.33	6.66	112	1.85	1.79
51	5.62	8.09	126	1.95	2.14
58	7.21	9.03	147	1.7	2.16
65	7.13	10.09	220	1.7	1.88
80	7.99	8.98			
114	7.42	9.29			
130	8.41	9.4			

Afin de palier les différences dans les concentrations en MES entre les analyses de respirométrie et pour faciliter les comparaisons entre bioréacteurs, les réponses correspondant à des microorganismes hétérotrophes sera exprimée en valeurs spécifiques, c'est-à-dire, normalisées par la concentration en MES.

Les résultats correspondant au BÀM R1 CP sont rapportés à ceux du BÀM R2 contrôle. Les figures montrent ainsi l'évolution de ce rapport (BÀM1/BÀM2) en fonction du temps. Nous faisons donc, l'hypothèse que les bioréacteurs fonctionnent formellement en parallèle a été justifiée au chapitre II.

Dans une première partie nous présentons les résultats concernant la respiration endogène puis ceux relatifs à la respiration exogène.

3.5.2.1 Microorganismes hétérotrophes

3.5.2.1.1 Effets sur la respiration endogène

Les figures 3.5.2.1.1 a et b, montrent l'évolution dans le temps du rapport entre bioréacteurs de la respiration endogène spécifique de microorganismes hétérotrophes.

Les résultats de la campagne I nous montrent qu'à partir du jour 37, nous observons une augmentation de la respiration endogène des microorganismes hétérotrophes présents dans le bioréacteur BÀM R1-CP par rapport au BÀM R2-Contrôle jusqu'au jour 115 où la respiration est légèrement inférieure à celle du BÀM R2 contrôle. C'est précisément dans ces jours (37- 70) que l'on observe une diminution du taux d'élimination du métabolite 4-Keto CP. Les jours 115 et 130 les taux d'élimination CP et 4-Keto CP restent stables autour de 80% (Cf. chapitre V).

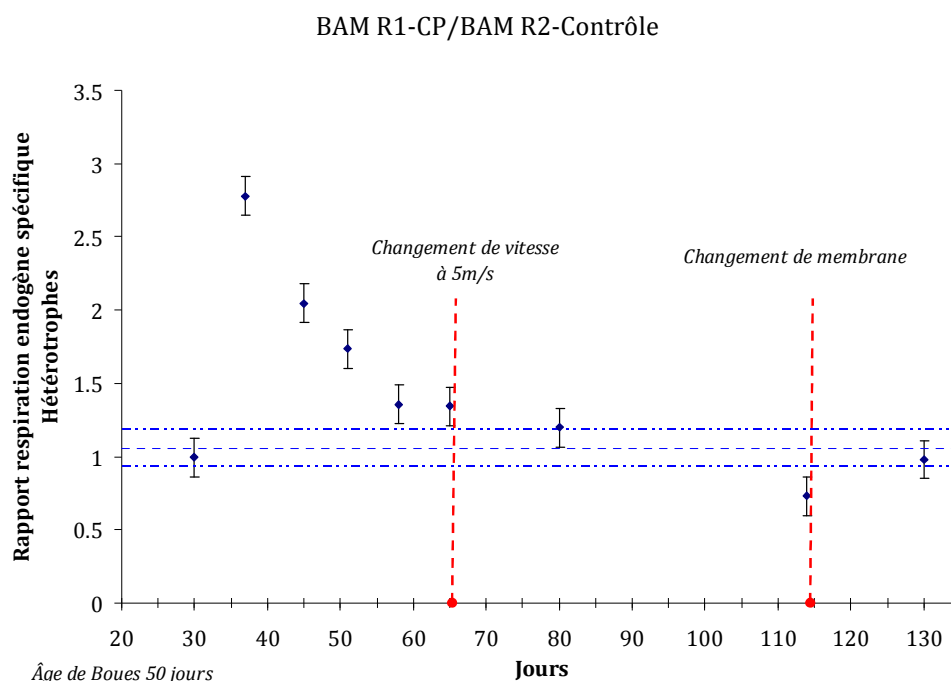


Figure 3.5.2.1.1 (a) Rapport respiration endogène spécifique de microorganismes hétérotrophes.
Campagne expérimentale I. Âge de Boues 50 jours.

Nous constatons le même comportement lors de la deuxième campagne, comme le montre la figure suivante :

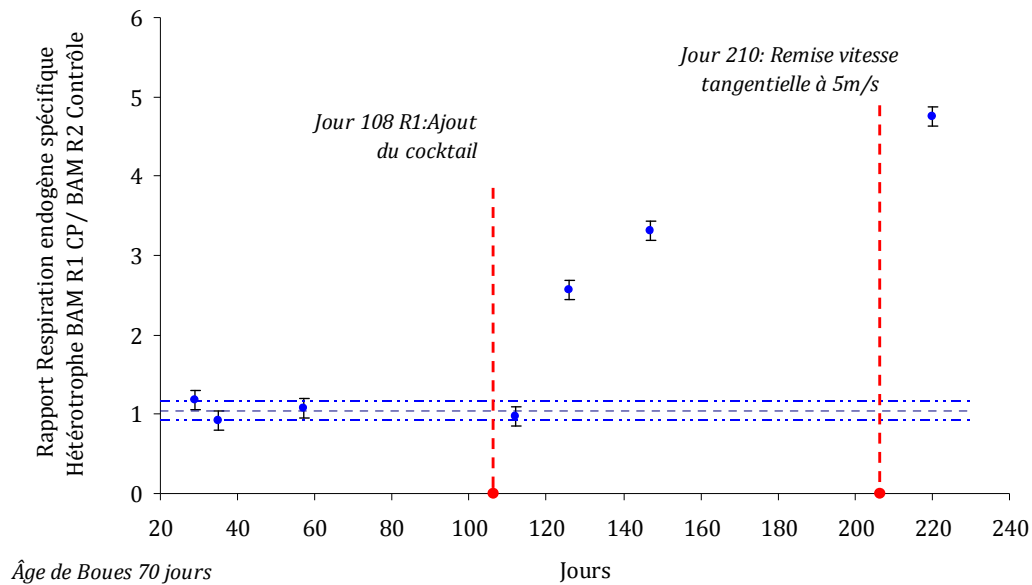


Figure 3.5.2.1.1 (b) Rapport respiration endogène spécifique de microorganismes hétérotrophes. Campagne expérimentale II. Âge de Boues 70 jours.

De la même façon, nous observons une augmentation de la respiration endogène des microorganismes hétérotrophes présents dans le bioréacteur BÀM R1-CP par rapport au BÀM R2-Contrôle.

3.5.2.1.2 Effets sur la respiration exogène

Les résultats correspondants à la campagne I sont montrés dans la figure 3.5.2.1.2 (a). Les valeurs sont plus importantes pour la boue du BÀM R1-CP que pour la boue du BÀM R2-contrôle du jour 45 jusqu'au jour 80 et le jour 130.

Nous rappelons qu'aux conditions opératoires étudiées pour les deux Bioréacteurs à membranes, les charges massiques appliquées sont de l'ordre de 0.13 ± 0.015 BÀM R1 CP et 0.11 ± 0.018 BÀM R2 Contrôle (Kg DCO/Kg MES/jour). Dans ces conditions, le substrat est limitant pour la croissance de microorganismes. Ceci favorise l'état physiologique de respiration endogène pour les microorganismes. La croissance n'a lieu que lorsque l'apport du substrat exogène est en excès par rapport à la quantité minimale nécessaire pour satisfaire les besoins énergétiques de maintenance (Witzig et al., 2002).

Le constat que les respirations spécifiques exogènes des microorganismes hétérotrophes présents dans le BÀM R1 CP sont supérieures à celles du BÀM R2 contrôle (campagne expérimentale I), pourrait s'expliquer par le raisonnement suivant : une diminution de la biomasse active est causée par les composés cytostatiques, alors la quantité spécifique (par microorganisme actif) de substrat disponible augmente. Or, en conditions de substrat limitant, une augmentation du substrat disponible a pour conséquence une élévation de la vitesse de consommation en oxygène des bactéries hétérotrophes toujours actives.

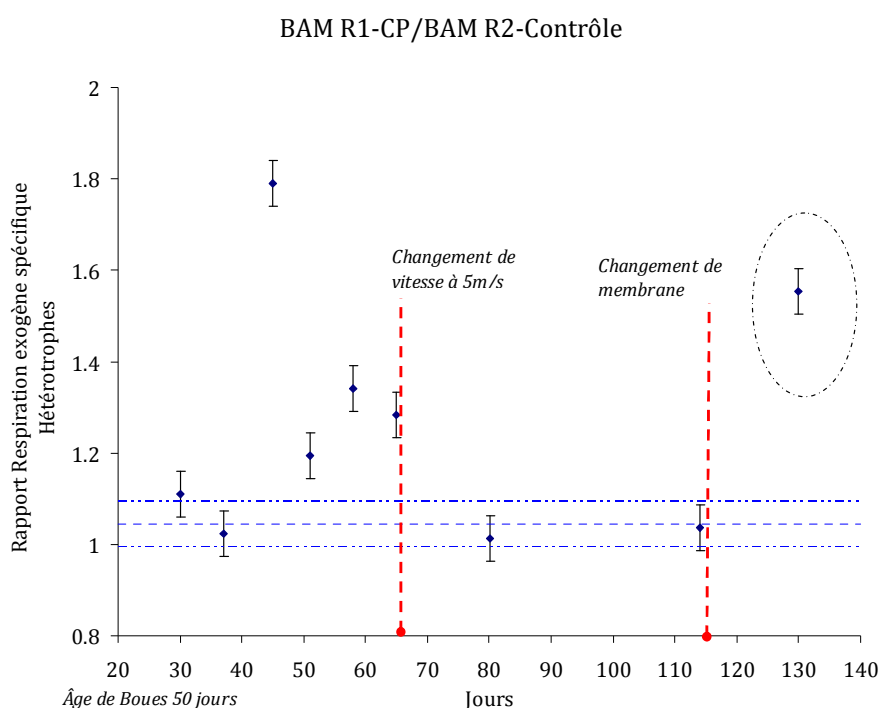


Figure 3.5.2.1.2 (a) Rapport respiration exogène spécifique de microorganismes hétérotrophes. Campagne expérimentale I. Âge de Boues 50 jours.

L'effet inhibiteur est plus clair dans les résultats correspondants à la deuxième campagne expérimentale où les concentrations en MES dans le respiromètre sont plus similaires entre les analyse faites.

Les jours 126 et 147 la respiration exogène des hétérotrophes est inférieure pour les boues du BÀM R1-CP par rapport aux boues du BÀM R2-contrôle. Le jour 147 correspond au point d'inhibition maximale de la respiration exogène par rapport aux autres jours. Cependant le jour 220 les respirations exogènes sont similaires pour les deux bioréacteurs.

Certains auteurs affirment que l'exposition continue aux micropolluants pourrait augmenter l'effet inhibiteur ou, au contraire, l'acclimatation et / ou la sélection de la biomasse pourrait réduire l'effet inhibiteur (Diosini et al., 2007). D'après ces résultats (Campagne expérimentale II), il semble que les microorganismes hétérotrophes s'adaptent à la présence du cyclophosphamide et ses principaux métabolites, après plus de 100 jours d'exposition.

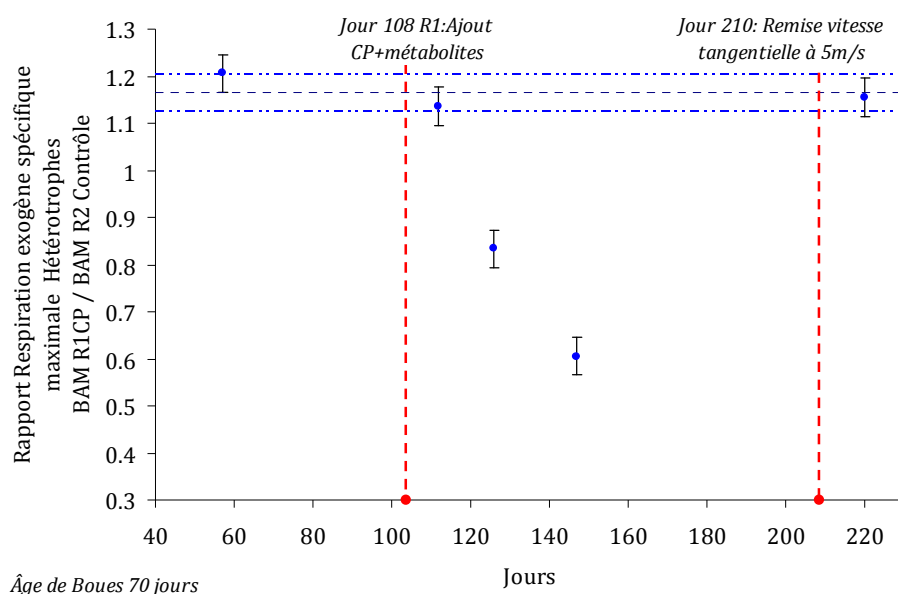


Figure 3.5.2.1.2 (b) Rapport respiration exogène spécifique de microorganismes hétérotrophes. Campagne expérimentale II. Âge de Boues 70 jours.

3.5.2.2 Microorganismes autotrophes

Nous avons remarqué au préalable lors de la discussion sur l'élimination de l'azote total, qu'un temps d'environ 1.5 fois l'âge de boues est nécessaire pour que les performances d'élimination d'azote de deux bioréacteurs soient similaires. Ce temps a été respecté lors de la deuxième campagne expérimentale avant d'ajouter le cocktail contenant les composés pharmaceutiques. Comme les effets du cocktail observés lors de la première campagne expérimentale sont semblables à ceux obtenus durant la deuxième campagne, nous allons présenter seulement les résultats concernant les microorganismes autotrophes à un âge de boues de 70 jours. Les résultats de la campagne I sont présentés dans l'annexe 5.

3.5.2.2.1 Effets sur la respiration endogène

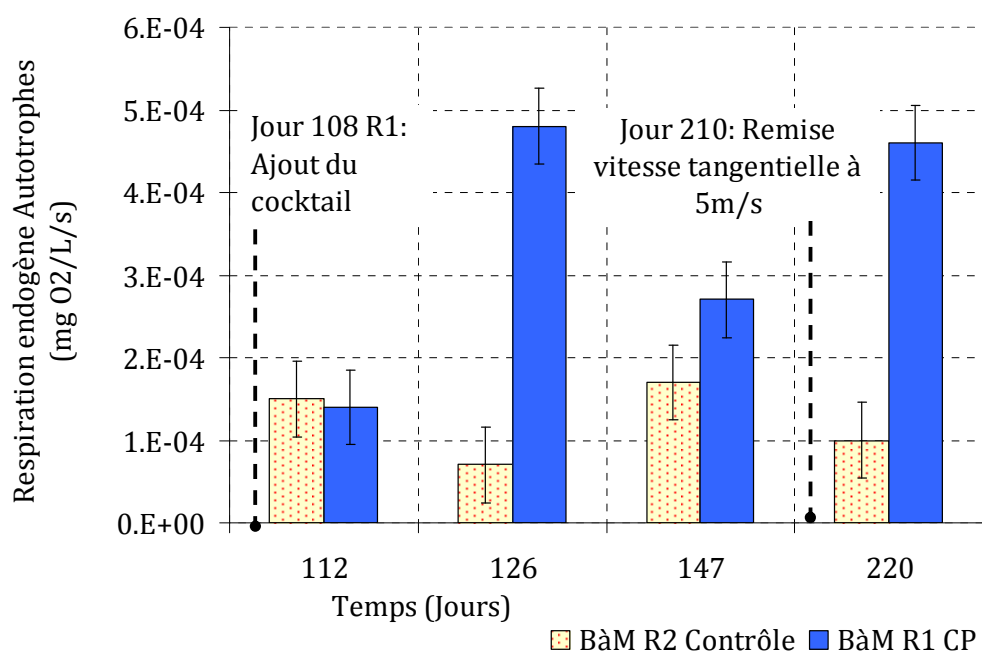


Figure 3.5.2.2.1 Evolution de la respiration endogène dans le temps.
Campagne expérimentale II. Âge de Boues 70 jours. Microorganismes autotrophes.

Nous observons une augmentation de la respiration endogène de microorganismes autotrophes présents dans le réacteur BÀM R1-CP par rapport au bioréacteur contrôle. Selon l'évolution de la respiration endogène dans le réacteur BÀM R1-CP, il y a une diminution le jour 147 par rapport aux jours 126 et 220.

3.5.2.2.2 Effets sur la respiration exogène

Les jours 126 et 147 la respiration des microorganismes autotrophes dans le BÀM R2-Contrôle est légèrement supérieure à celle des microorganismes dans le BÀM R1-CP.

Globalement les effets observés sur les microorganismes autotrophes sont les mêmes que pour les microorganismes hétérotrophes, cependant les effets sont plus facilement remarquables pour les microorganismes hétérotrophes.

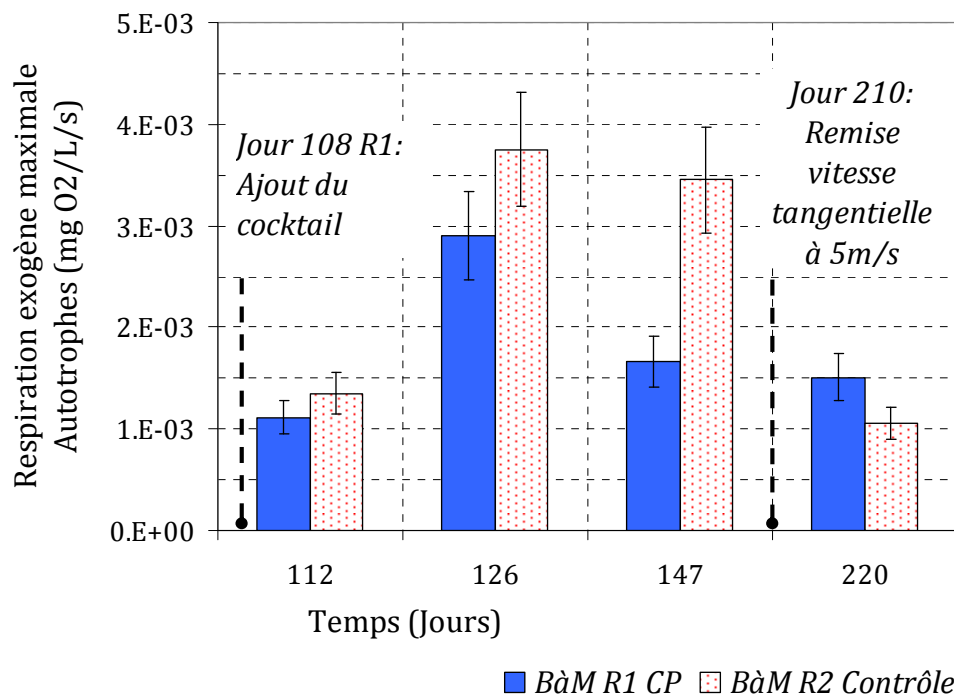


Figure 3.5.2.2.2 Evolution de la respiration Exogène dans le temps. Campagne expérimentale II. Âge de Boues 70 jours. Microorganismes autotrophes.

3.5.2.3 Discussion (activité biologique)

En accord avec les deux premiers tests de respirométrie réalisés (des effets à court terme), nous remarquons que les effets liés à la présence de cytostatiques étudiés sur la biomasse épuratrice au sein du bioréacteur BÀM R1 CP, ne sont observables qu'après plusieurs jours d'exposition.

En outre, la présence de CP et ses principaux métabolites augmente les besoins énergétiques de maintenance de microorganismes hétérotrophes et autotrophes. Une diminution de la respiration exogène est ainsi observée pour les deux groupes de microorganismes.

L'augmentation des besoins de maintenance en présence de composés chimiques toxiques a déjà été rapportée au préalable. Ray et Peters (2008) ont étudié l'impact du stress chimique sur le métabolisme microbien en utilisant des produits chimiques modèles tels que le 2,4-dinitrophénol (DNP), et le pentachlorophénol (PCP). L'activité biologique de *Pseudomonas aeruginosa* a été mesurée dans des réacteurs batch, en présence et en absence d'un composé toxique chimique à des concentrations sub-létales. Le stress chimique est défini dans cette étude comme l'exposition

d'une cellule à un produit chimique polluant, à des concentrations sous-létales, mais assez puissant pour obtenir des réponses d'adaptation et de protection. Les auteurs signalent une augmentation du coefficient de décroissance cellulaire avec l'augmentation de la concentration en PCP et DNP.

En outre, dans cette étude, Ray et Peters (2008) formulent l'hypothèse suivante concernant l'impact d'un stress chimique sur le métabolisme microbien : entre une concentration létale et une concentration inoffensive, il existe toute une gamme de concentrations où l'exposition d'une cellule à un facteur de stress provoque un détournement du carbone et/ou de l'énergie de la croissance et donc une diminution du rendement observé de production de biomasse. Autrement dit, il y a des concentrations où un facteur de stress a un effet d'inhibition pouvant diminuer en même temps le taux de croissance et la vitesse de consommation de substrat. Finalement, il y a des concentrations où un facteur de stress a un effet toxique conduisant à la mort d'une partie des cellules ou de la totalité de la population.

Dans ce cadre, l'augmentation observée de la respiration endogène en présence du cyclophosphamide et ses principaux métabolites par rapport au BÂM R2 contrôle suggèrent que l'exposition des microorganismes aux composés cytotoxiques aux concentrations étudiées provoque un détournement du carbone et/ou de l'énergie de la croissance vers des réponses d'adaptation et de protection et, comme nous le constatons, une diminution du rendement de production de biomasse peut être observé. En plus, le fait que la respiration exogène diminue aussi pour les microorganismes exposés aux composés pharmaceutiques étudiés, montre que la/les concentration(s) d'un/des composés/métabolite est (sont) assez importante(s) pour diminuer au même temps la vitesse de consommation de substrat. Toutefois, cet effet inhibiteur est compensé par la forte concentration en biomasse présente dans le bioréacteur permettant de maintenir des performances globales élevées dans l'élimination de la DCO et de l'azote total.

3.6 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté les résultats des deux campagnes expérimentales visant à caractériser l'influence de la présence de Cyclophosphamide et ses principaux métabolites sur les performances du procédé. Deux âges de boues ont été évalués, 50 jours lors de la première campagne et 70 jours lors de la deuxième. La comparaison entre les performances du bioréacteur à membrane **BÀM R1 CP** en présence de cyclophosphamide et ses principaux métabolites et les performances du Bioréacteur témoin **BÀM R2 Contrôle**, a permis d'évaluer l'influence de ces composés pharmaceutiques sur le procédé.

Les performances globales d'élimination de la DCO et de l'azote total sont très similaires et élevées pour les deux bioréacteurs durant les deux campagnes expérimentales. Nous pouvons donc conclure que le cocktail de Cyclophosphamide et ces métabolites aux conditions opératoires étudiées n'a pas d'influence significative sur l'élimination globale de la DCO et de l'azote total. Cependant, des modifications sur la matrice biologique (fragilisation mécanique) sont observées durant la première campagne expérimentale (augmentation de la DCO dans le surnageant par rapport au BÀM R2 contrôle), étant accentuées par l'augmentation des contraintes de cisaillement imposés par la pompe de circulation après une élévation de la vitesse tangentielle le long de la membrane.

Les microorganismes exposés au cocktail de cytotoxiques, montrent des taux de respiration endogènes plus importants et des taux de respiration exogènes inférieurs à ceux présents au sein du bioréacteur BÀM R2 Contrôle. Les effets ne sont observés que plusieurs jours après l'ajout du cocktail. Des résultats obtenus lors de la deuxième campagne semblent indiquer que les microorganismes (hétérotrophes) s'adaptent à ces micropolluants après plus de 100 jours d'exposition aux composés pharmaceutiques. Egalement, une diminution de la production de boues du BÀM R1 CP par rapport au BÀM R2 contrôle est observée. Cette diminution de la production de boues et l'augmentation du taux de respiration endogène par rapport au BÀM R2 contrôle, suggèrent que le stress chimique causé par le cyclophosphamide et ses métabolites provoque un détournement du carbone et/ou de l'énergie de la croissance vers des réponses d'adaptation et de protection.

En outre, l'effet inhibiteur sur l'assimilation du substrat exogène (diminution du taux de respiration exogène) serait « amorti » par la forte concentration en biomasse présente dans le bioréacteur permettant de maintenir des performances globales élevées dans l'élimination de la DCO et de l'azote total.

Nous pouvons supposer que, le bioréacteur fonctionnant en conditions de substrat limitant, l'effet inhibiteur pourrait affecter une partie de la population microbienne; le restant de la population toujours active augmenterait sa vitesse de respiration spécifique exogène comme conséquence d'une augmentation du substrat disponible par microorganisme actif.

La robustesse du bioréacteur à membrane externe observée est donc liée aux concentrations élevées en biomasse, à l'enrichissement de la population autotrophe comme conséquence des âges de boues élevés (avantage des BaM), ainsi qu'à la membrane filtrante qui joue un rôle important dans la rétention de solides et dans la qualité du perméat en retenant en grande partie la DCO du surnageant dans le bioréacteur.

Des tests d'identification de la population bactérienne présente dans les deux BaM par PCR-TRLFP, seront réalisés à la suite de cette thèse au Laboratoire d'Ecologie Moléculaire-Microbiologie de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour. La comparaison entre les résultats de deux bioréacteurs, permettra d'évaluer l'influence du cocktail étudié sur la sélection de la population bactérienne.

Chapitre IV

**Influence du Cyclophosphamide et ses principaux
métabolites sur les propriétés physico-chimiques de la
liqueur mixte ; conséquences sur le colmatage.**

Ce chapitre a pour but de présenter les résultats des deux campagnes expérimentales visant à caractériser l'influence du Cyclophosphamide et ses principaux métabolites sous l'angle physico-chimiques de la liqueur mixte et le caractère colmatant de la boue activée.

De la même manière que dans le chapitre précédent, l'influence sera déterminée par comparaison entre les performances du bioréacteur BÀM R1 CP en présence du cocktail de composés pharmaceutiques et le bioréacteur BÀM R2 contrôle.

Les performances seront évaluées par les dosages des substances polymériques extracellulaires solubles (EPS solubles) dans le surnageant des bioréacteurs et à la sortie du procédé, ainsi que par l'évolution de la pression transmembranaire des deux bioréacteurs durant les deux campagnes expérimentales, la distribution de la taille de particules et la résistance à la filtration.

Ce chapitre se compose de trois parties : les deux premières décrivent l'influence du cocktail pharmaceutique étudié sur la concentration en exopolymères dans le surnageant du bioréacteur à membrane et sur la taille de floccs, respectivement. La dernière partie présente les conséquences de ces modifications de la liqueur mixte sur le colmatage de la membrane.

4.1 Influence du Cyclophosphamide et ses principaux métabolites sur la concentration et la nature des exopolymères dans le surnageant du Bioréacteur à membrane.

Les exopolymères présents dans le surnageant des boues des bioréacteurs ont été caractérisés par des polysaccharides exprimés en mg-équivalent D-glucose/L, des protéines (mg-équivalent BSA/L), et des substances humiques (mg-équivalent acides humiques/L). Dans ce paragraphe, les résultats obtenus seront exposés et discutés séparément pour chacune des deux campagnes expérimentales.

4.1.1 Campagne expérimentale I. Âge de Boues 50 Jours

Protéines

Nous rappelons que la méthode utilisée pour l'analyse des protéines est celle de Frölund (1995), l'influence des substances humiques est prise en compte dans la mesure (Cf Chapitre II). Les concentrations en substances humiques retrouvées au cours de l'étude dans le surnageant et dans le perméat ont été toujours très élevées par rapport à celles en protéines. Comme le montre la

figure 4.1.1.1, les concentrations retrouvées en protéines sont très faibles et inférieures à 50 mg/L. A cet ordre de grandeur, l'erreur de la méthode est assez importante (Cf Chapitre II) et on atteint la limite basse de la méthode. Ainsi, faire des comparaisons entre les performances des deux réacteurs par rapport aux concentrations en protéines devient alors très délicat.

Néanmoins, une production des protéines est clairement observable entre le jour 21 après l'ajout du cocktail et le jour 65 avant le changement de la vitesse tangentielle, dans les deux bioréacteurs. Pourtant, le fait que ce phénomène soit observé dans les deux bioréacteurs suggère que cette augmentation de la concentration en protéines est étroitement liée soit aux conditions opératoires, soit à un élément provenant de l'effluent et non pas à l'injection du cocktail pharmaceutique. Cette augmentation de la concentration en protéines pourrait s'expliquer par une production importante d'enzymes extracellulaires nécessaires pour la dégradation des substrats présents dans l'alimentation des réacteurs et/ou pour l'hydrolyse des produits microbiens solubles présents dans le surnageant.

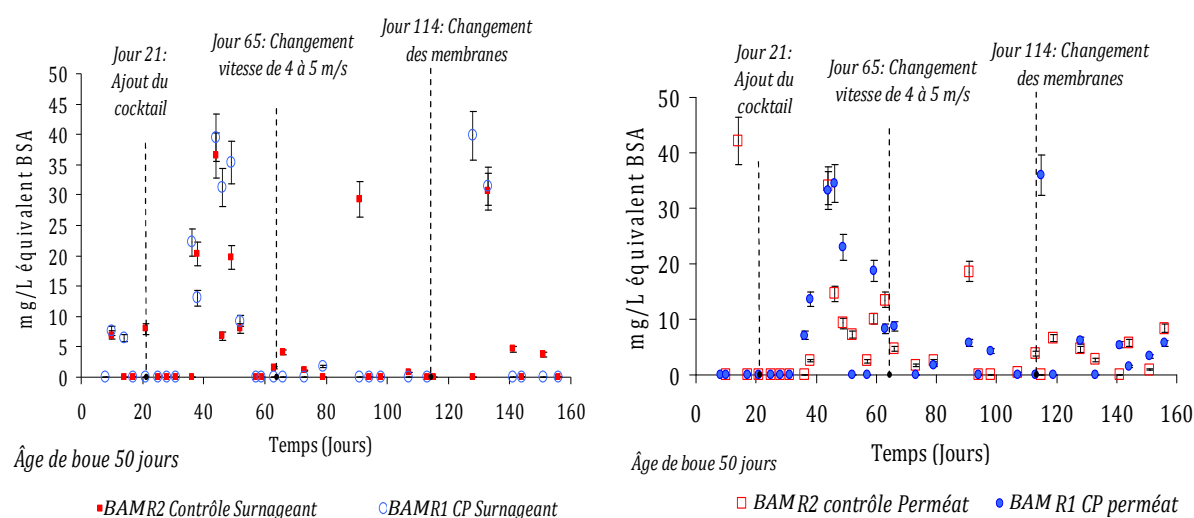


Figure 4.1.1.1 Evolution de la concentration en protéines dans le surnageant et dans le perméat des Bioréacteurs, BÂM R1 CP et BÂM R2 contrôle. Campagne expérimentale I.

Substances humiques et polysaccharides

Des différences remarquables entre les performances des deux bioréacteurs sont observées dans la concentration en substances humiques et en polysaccharides. Les figures 4.1.1.2 et 4.1.1.3 montrent l'évolution de la concentration en substances humiques et en polysaccharides en fonction du temps, respectivement.

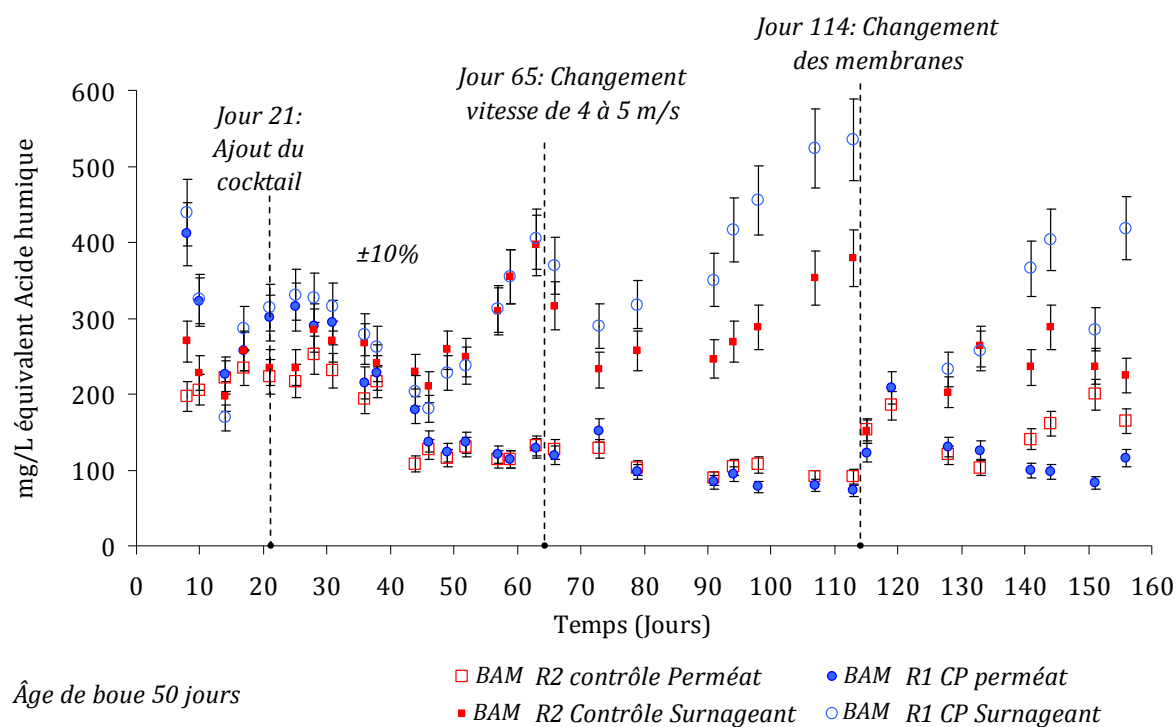


Figure 4.1.1.2 Evolution de la concentration en substances humiques dans le surnageant et dans le permétat des Bioréacteurs, BÀM R1 CP et BÀM R2 contrôle. Campagne expérimentale I.

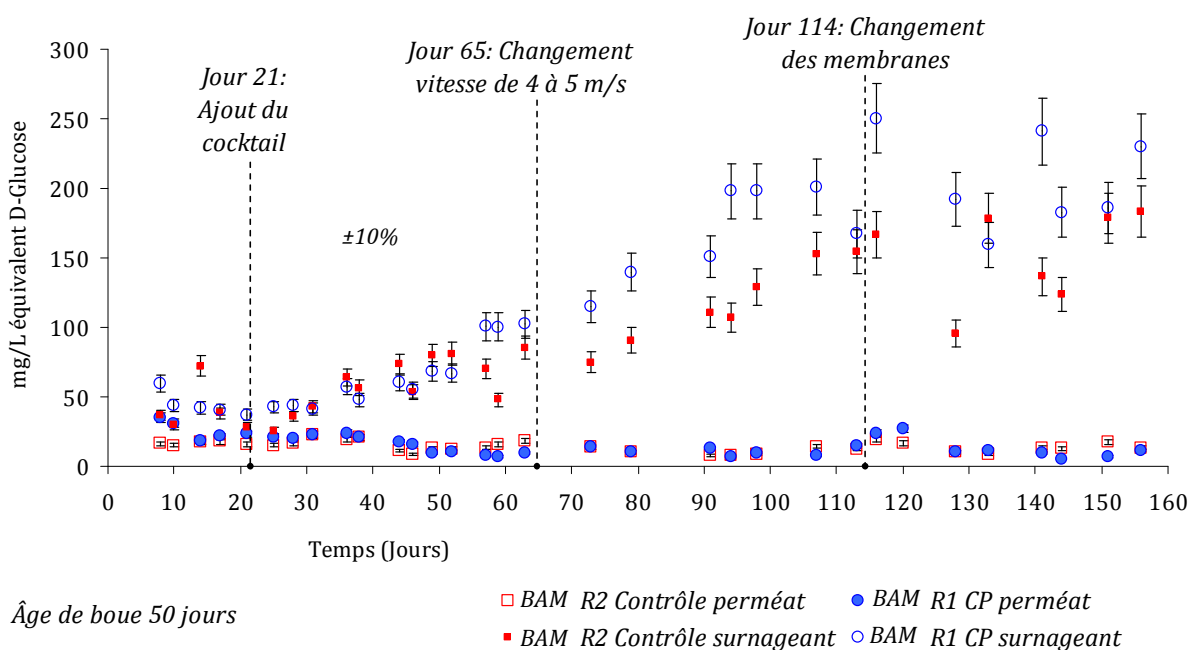


Figure 4.1.1.3 Evolution de la concentration en polysaccharides dans le surnageant et dans le permétat des Bioréacteurs, BÀM R1 CP et BÀM R2 contrôle. Campagne expérimentale I.

Les évolutions des concentrations en polysaccharides et en substances humiques dans les perméats des réacteurs sont très similaires. Cependant, des différences dans la concentration en substances humiques dans le perméat des deux bioréacteurs (plus importante dans le perméat du BÀM R2 Contrôle par rapport au BÀM R1 CP) ont été observées dès le jour 140. Ceci correspond à une rétention moins importante de ces composés par la membrane du BÀM R2 Contrôle (Cf Figure 4.1.1.4).

Tant pour les polysaccharides que pour les substances humiques, les différences entre les deux bioréacteurs sur les concentrations dans le surnageant ne sont remarquables qu'après l'augmentation de la vitesse tangentielle de 4 à 5 m/s.

Les concentrations des surnageants en substances humiques et en polysaccharides sont plus importantes dans le BÀM R1 CP que dans le BÀM R2 Contrôle après ce changement. Cet écart se maintient tout au long de la campagne, y compris après le changement des membranes le jour 114 et correspond à l'écart observé entre la DCO du surnageant du BAM R1 CP par rapport au BAM R2 contrôle dans le chapitre III.

Il est reconnu qu'en particulier dans le système Bioréacteur à membrane externe à flux tangentiel, des forts taux de cisaillement sont imposés sur les flocs biologiques en raison de leur recyclage dans l'ensemble du système. Les influences du cisaillement ont déjà été signalées sur des différents aspects (Kim Jae-Seok et al., 2001 ; Wisniewski et Grasmick, 1998): altération de la morphologie, libération des composés intracellulaires ou extracellulaires, variation de la viabilité de la biomasse, et changements dans la filtrabilité de la suspension.

Au préalable, des études ont montré qu'après une augmentation de la contrainte de cisaillement imposée aux cellules due à l'augmentation de la vitesse de recirculation a pour conséquence la libération d'exopolymères par les cellules vers la liqueur mixte.

En effet Kim et al., (2001) ont démontré que les ruptures de flocs engendrées par les contraintes hydrodynamiques entraînaient un relargage de matières organiques solubles dans le bioréacteur (de 40 à 100 mg DCO/L dans le cas d'une recirculation par pompe rotative). Par ailleurs, Liu et Tay (2002) ont montré que plus les contraintes appliquées sur un biofilm sont importantes, plus ce dernier gagne en densité et plus la concentration en polysaccharides extracellulaires est importante. Cependant, ceci n'explique pas les écarts observés entre les concentrations en EPS dans le surnageant des bioréacteurs, qui ont subi les mêmes contraintes hydrodynamiques. De ce

fait, nous pouvons avancer que la différence est due à une modification sur la biomasse épuratrice consécutive à la présence des molécules cytotoxiques. Dans les paragraphes suivant nous allons développer et structurer cette proposition.

Les substances humiques sont directement amenées par l'effluent d'entrée (cf annexe 8). Ces composés, considérés dans ce cas comme des EPS solubles, ne sont pas produits par les microorganismes, pour cette raison, leur concentration dans le surnageant dépend de leur adsorption sur les floccs microbiens, leur élimination par la purge et leur passage à travers la membrane. Comme le montre la figure 4.1.1.2, et quel que soit le réacteur considéré, la rétention des substances humiques par l'ensemble membrane + dépôt est très élevée.

Concernant les polysaccharides, leur concentration dans le surnageant dépend de la production et/ou de l'assimilation de ces composés par les microorganismes, de leur élimination par la purge et de leur passage à travers la membrane. De la même manière, la figure 4.1.1.3 montre que les polysaccharides sont retenus pour une bonne part par l'ensemble membrane + dépôt.

Les figures 4.1.1.4 et 4.1.1.5 montrent les pourcentages de rétention par la membrane des substances humiques et des polysaccharides en fonction du temps durant la campagne expérimentale I, respectivement.

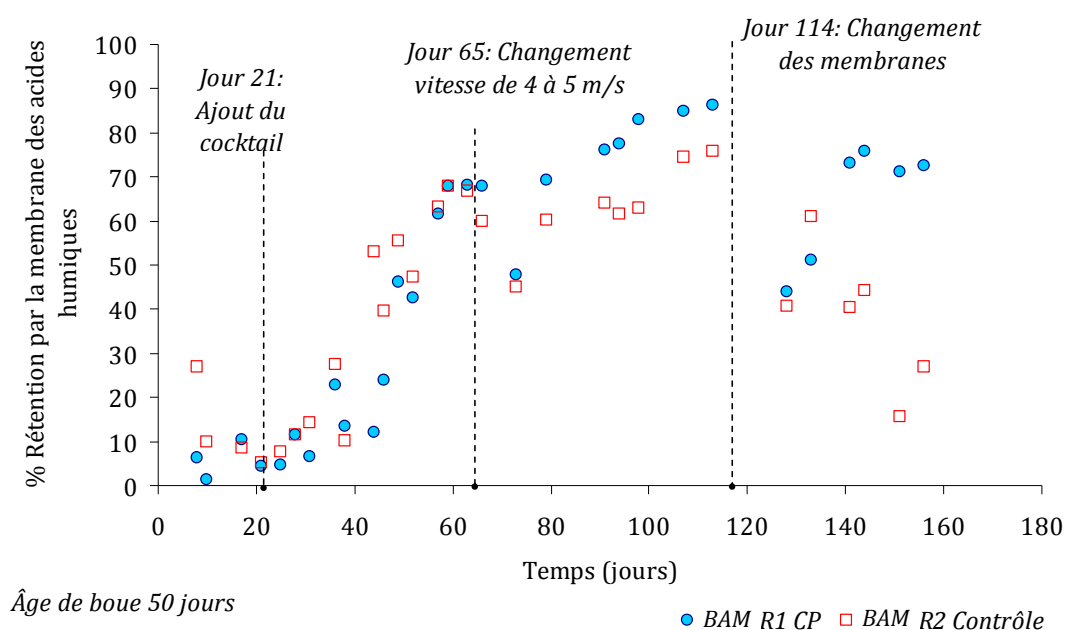


Figure 4.1.1.4 Campagne expérimentale I.
Evolution du pourcentage de rétention par la membrane des substances humiques.

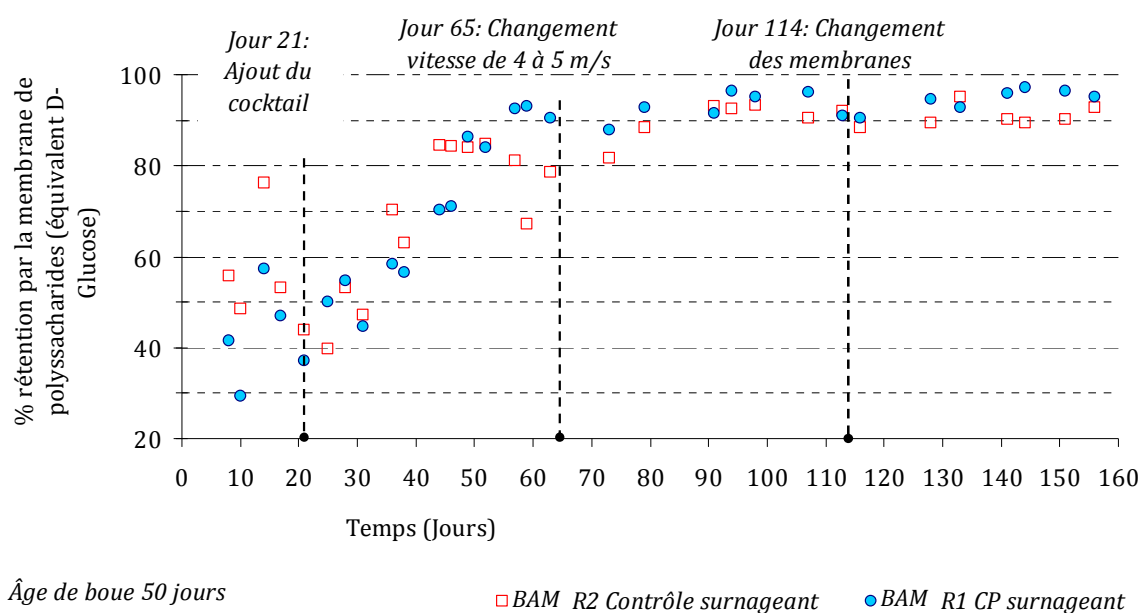


Figure 4.1.1.5 Campagne expérimentale I.
Evolution du pourcentage de rétention par la membrane des polysaccharides.

Etant donné que les bioréacteurs sont alimentés de la même façon et fonctionnent dans des conditions opératoires identiques, les différences dans les concentrations en substances humiques, dans les surnageants issus de la composition de l'influent ne sont influencées que par l'aptitude de rétention par la membrane. Dans le cas des polysaccharides, en plus des différences dans la rétention par l'ensemble membrane + dépôt, la concentration dépendra aussi de la production et/ou assimilation de ces composés par les micro-organismes.

La figure 4.1.1.4 met en évidence que, à partir du jour 65, le pourcentage de rétention par la membrane des substances humiques dans le bioréacteur BÀM R1 CP, est plus élevé que dans le BÀM R2 contrôle. Nous pouvons donc dire que la concentration plus élevée en substances humiques dans le bioréacteur BÀM R1 CP par rapport au BÀM R2 Contrôle est liée à un pourcentage de rétention par l'ensemble membrane + dépôt des ces composés plus important dans ce BÀM que dans le BÀM R2 Contrôle et donc à l'état de colmatage de la membrane.

Toutefois, ceci n'est pas le cas pour les polysaccharides. La figure 4.1.1.5 montre que dans les deux BÀM, après le changement de la vitesse tangentielle, les pourcentages de rétention par la membrane des polysaccharides sont très semblables et toujours supérieures à 90%. De ce fait, les différences retrouvées sur les concentrations en polysaccharides dans les surnageants entre les deux BÀM, sont fortement liées à l'activité microbienne associée à une sécrétion par la biomasse plus importante et/ou à des différences de cinétiques de dégradation de ces polymères.

HPSEC/FTIS

Afin de mieux appréhender les différences observées sur les concentrations en exopolymères quelle que soit leur nature dans le surnageant des réacteurs, une investigation plus approfondie de la caractérisation (masse moléculaire et quantification) d'EPS a été menée : chromatographie d'exclusion de taille (HPSEC en anglais « High pressure size exclusion chromatography ») pour la masse moléculaire et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Fourier Transformed Infrared Spectroscopy) pour identifier les espèces chimiques. Les analyses ont été menées par Catalina Avella dans le cadre de sa thèse au laboratoire Environnement et Minéralurgie de l'université de Nancy, grâce à une collaboration entre les deux laboratoires. Suite à cette collaboration, un article a été proposé (Annexe 6) Nous avons voulu citer les résultats les plus importants issus de ce travail :

L'étude a été effectuée sur une période de quatre semaines sur les deux BÀM. Cette période représente le dernier mois de la campagne expérimentale I (phase stable, environ 3 fois l'âge de boue), alors que le temps total de fonctionnement des réacteurs a été de 160 jours.

Le principal effet de la présence du cocktail des composés pharmaceutiques étudiés sur la boue est montré sur la Figure 4.1.1.6, considérant chaque partie de la boue, liquide et solide, et le perméat: la concentration en exopolymères solubles (EPS, substances polymériques extracellulaires) augmente sur la période de 4 semaines, de manière significative dans le surnageant du réacteur BÀM R1 CP, tandis que dans le BÀM R2 contrôle il est resté constant (Fig. 4.1.1.6a et Fig. 4.1.1.6d respectivement). Un résultat très important est que ce même phénomène a été observé également dans le cas des **EPS liés à la boue** (Fig.4.1.1.6 c et Fig. 4.1.1.6f).

Les molécules EPS ont un large éventail de dimensions moléculaires, sans une famille de taille prédominante. Pour nos échantillons, un seul grand pic est observé avec un maximum au volume d'élution V_e d'environ 12 ml, accompagné par un très petit pic avec des composés de très haute taille moléculaire (V_e environ 7 mL) et un très petit pic avec des composés de faible taille moléculaire (V_e environ 13ml). Le pic au volume d'élution V_e d'environ 12 mL pourrait correspondre à une masse moléculaire de 18.000 Da pour les protéines et à 6000 Da pour les polysaccharides (figure 5.1.1.6 a et b). La présence d'un seul pic dans le surnageant pour l'échantillon du jour 23 est considéré comme un accident (observé également dans le perméat correspondant, la figure 4.1.1.6b).

Le petit pic avec V_e d'environ 7 ml correspondant à des composés de masse moléculaire importante (Protéines de 670.000 Da, et polysaccharides de 404.000 Da) est présent pour les deux réacteurs, cela signifie que les espèces correspondantes ne sont pas influencées par la présence du cocktail de molécules pharmaceutiques.

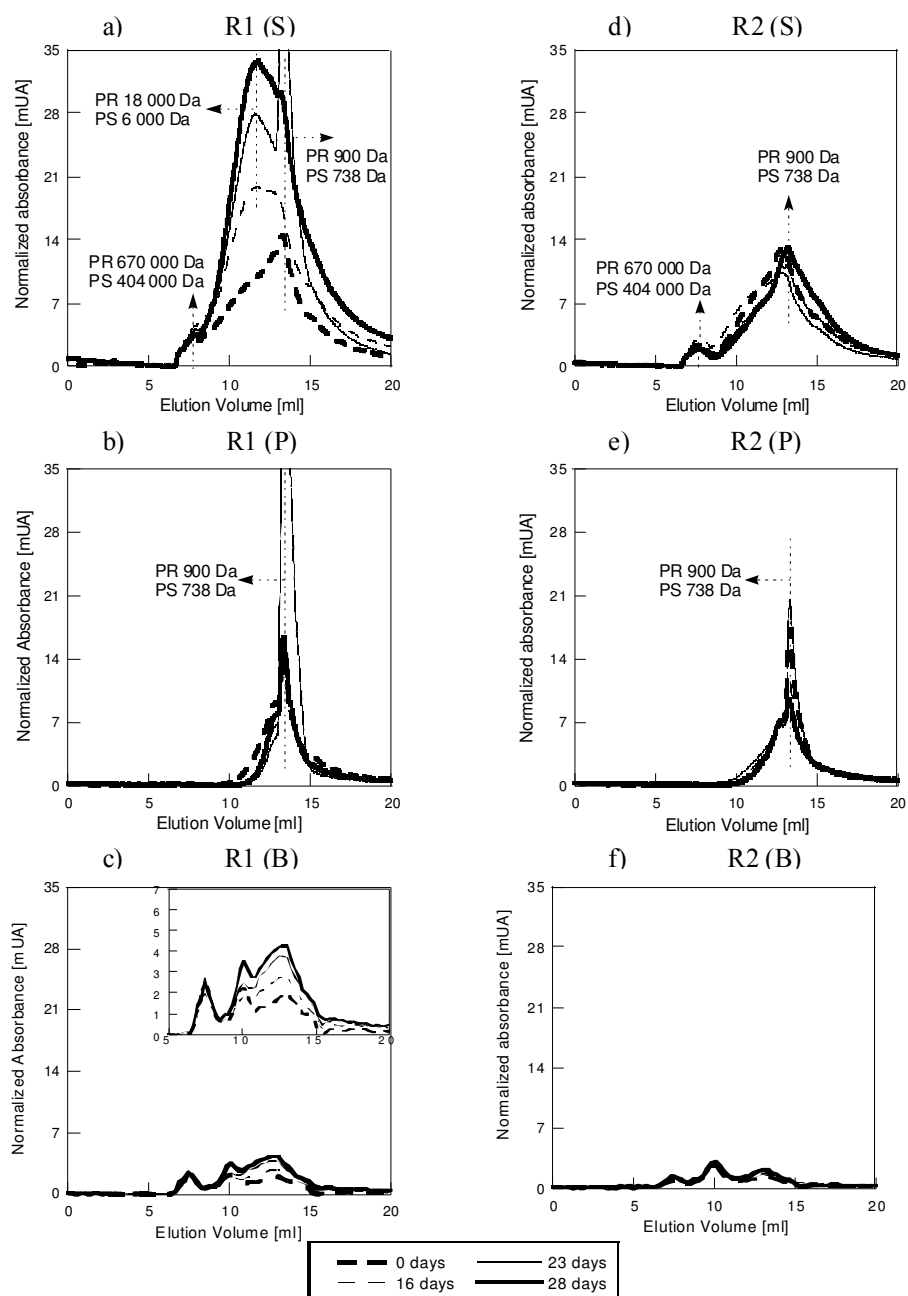


Fig. 4.1.1.6. Chromatogrammes Normalisés de EPS solubles présents dans le surnageant (A et D) et dans le perméat (B et E) et les chromatogrammes normalisés de EPS liées (C et F) dans les réacteurs BÂM R1 CP et BÂM R2 Contrôle, respectivement.

Les profils chromatographiques des perméats (figure 4.1.1.6b et 4.1.1.6e) sont beaucoup plus simples que ceux des surnageants (figure 4.1.1.6a et 4.1.1.6d), les molécules de grandes tailles ne sont plus présentes dans le perméat (retenues par la membrane). Selon l'étalonnage de la colonne, seules les molécules plus petites que 900 Da pour les protéines et plus petites que 700 Da pour les polysaccharides sont présentes dans les perméats des deux réacteurs (V_e d'environ 7 mL). Les mêmes profils chromatographiques ont été ainsi obtenus en présence et en l'absence du cocktail pharmaceutique pour ces perméats.

Il semble donc que la présence de substances toxiques (Cyclophosphamide et métabolites) stimule les mécanismes de survie et de production des EPS (phénomène observé sur les **EPS liés** et sur les EPS solubles) avec une production légèrement plus forte des polysaccharides que des protéines. Les molécules excrétées à cause de la présence des médicaments sont alors retenues par la membrane (V_e : 12 mL, 18.000 Da pour les protéines et à 6000 Da pour les polysaccharides). Cela démontre clairement que la filtration par la membrane élimine avec succès ces espèces de grande taille (présentes dans le BAM R1CP et pas dans le BAM R2 Contrôle) qui représentent une part importante de macromolécules solubles. Ainsi, il est possible que ces molécules soient étroitement liées au phénomène de colmatage observé dans le BAM R1 CP.

Un examen plus détaillé des EPS produits a été réalisé par spectroscopie FTIR. L'approche Infrarouge a montré que la réponse globale IR des EPS peut être décrite comme la combinaison de trois espèces chimiques majoritaires : Des **polysaccharides**, des amides ou des amines et des nitrates, respectivement.

Il serait intéressant de déterminer la nature de ces molécules connaissant d'autres caractéristiques en plus des leurs fonctions prédominantes et de leur poids moléculaire. Toutefois, la grande diversité structurale des polysaccharides microbiens témoigne de l'adaptation des microorganismes à des environnements très différents. Dans notre cas, la présence d'un groupe aminé et des polysaccharides fait penser à des grandes familles comme les hétéro-polysaccharides ou bien les glycoprotéines (les hétéro-polysaccharides sont formés d'unités répétitives, variables dans leur taille, mais d'autres groupes peuvent aussi être présents, tels des groupements phosphate, amino ou acétyl. La production d'hétéro-polysaccharides est très fréquente chez les microorganismes. Une glycoprotéine est une protéine portant un groupement de polysaccharide et une chaîne polypeptidique).

4.1.2 Campagne expérimentale II. Âge de Boues 70 Jours

L'évolution de la concentration en protéines, en substances humiques et en polysaccharides dans le surnageant et dans le perméat des réacteurs BÀM R1 CP et BÀM R2 contrôle durant la deuxième campagne expérimentale (Âge de boues 70 jours) est montrée dans les figures 4.1.2.1, 4.2.1.2 et 4.1.2.3, respectivement. Comme le montrent les figures, et dans la limite de l'exactitude des méthodes de dosages utilisées, nous n'observons pas de différence sur l'évolution de la concentration en EPS solubles entre les deux bioréacteurs durant cette campagne expérimentale.

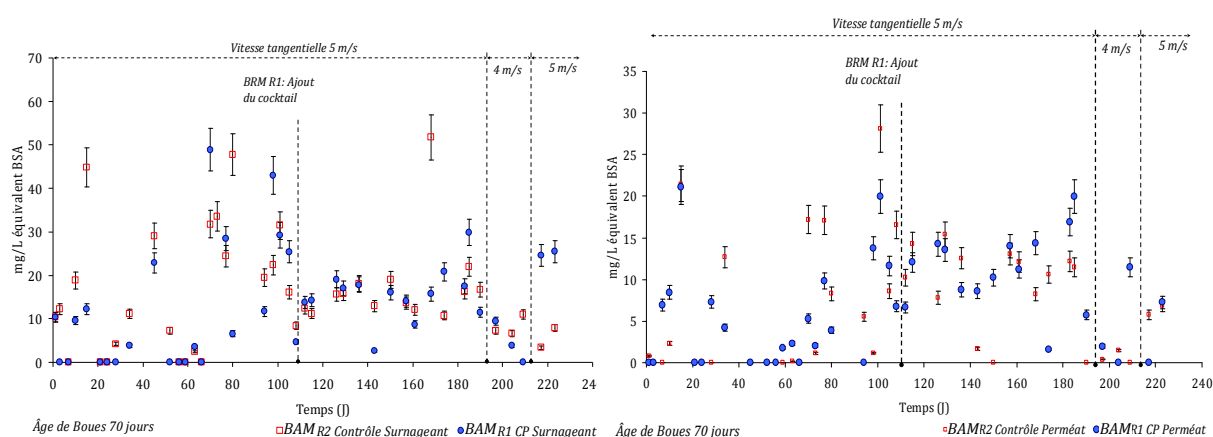


Figure 4.1.2.1 Campagne expérimentale II. : Evolution de la concentration en protéines dans le surnageant et dans le perméat des Bioréacteurs, BÀM R1 CP et BÀM R2 contrôle.

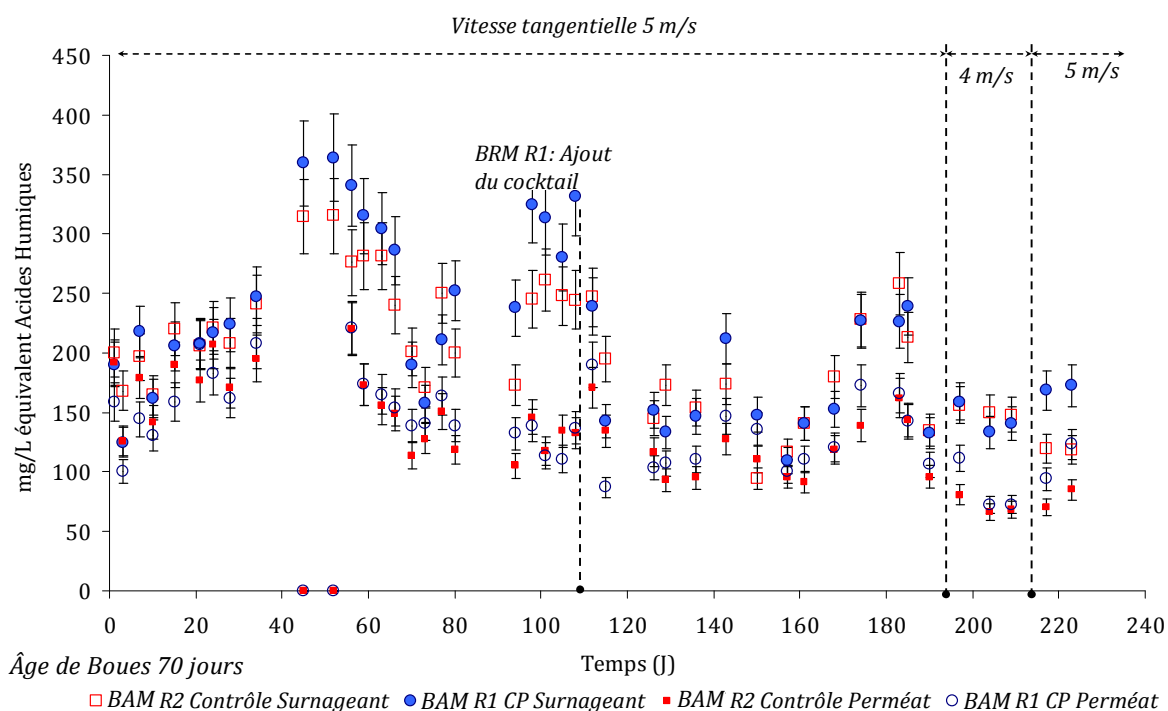


Figure 4.1.2.2 Evolution de la concentration en substances humiques dans le surnageant et dans le perméat des Bioréacteurs, BÀM R1 CP et BÀM R2 contrôle. Campagne expérimentale II.

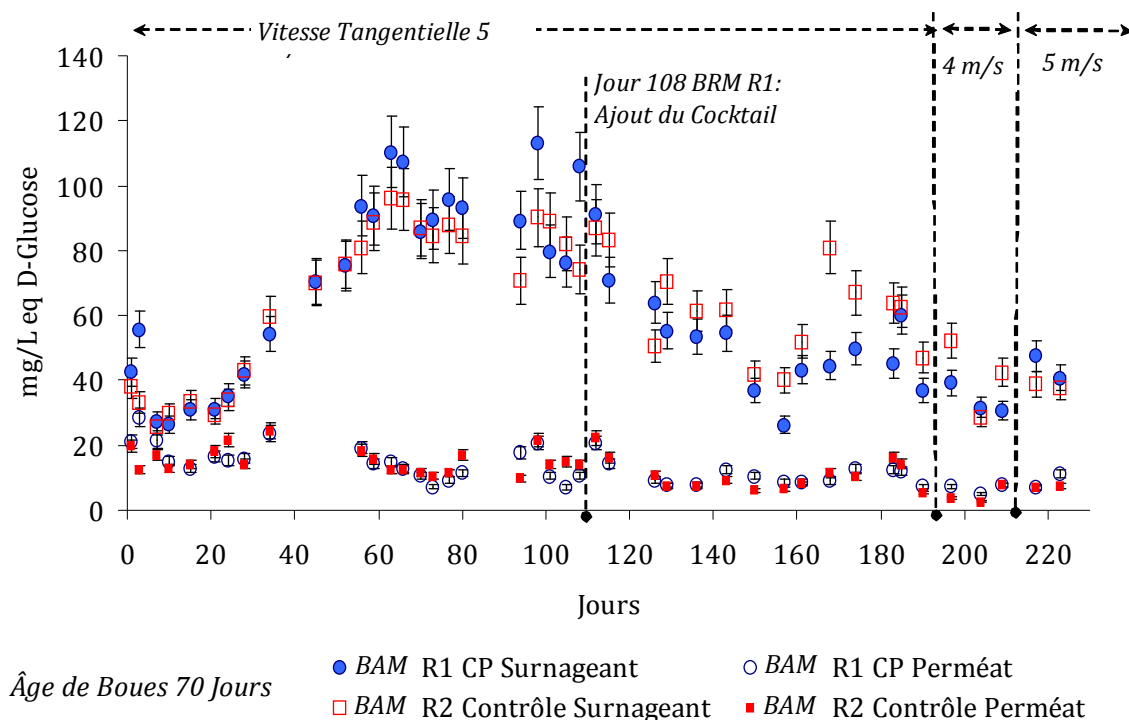


Figure 4.1.2.3 Evolution de la concentration en polysaccharides dans le surnageant et dans le permétat des Bioréacteurs, BÂM R1 CP et BÂM R2 contrôle. Campagne expérimentale II.

Nous avons observé lors de la première campagne expérimentale que les différences entre les deux bioréacteurs concernant les concentrations des EPS dans les surnageants, ne sont remarquables qu'après l'augmentation de la contrainte de cisaillement sur les flocs microbiens. Ceci n'est pas le cas lors de cette dernière campagne expérimentale. Il faut rappeler que lors de la deuxième campagne expérimentale nous avons augmenté l'âge de boues de 50 jours à 70 jours. Nous avons aussi pris soin de faire fonctionner les pilotes sur une durée d'au moins un âge de boues sans ajouter le cocktail pour permettre à la biomasse de s'adapter aux conditions opératoires imposées, avant de la stresser avec la présence des composés pharmaceutiques. Cette fois-ci, la vitesse tangentielle au démarrage était de 5m/s. Des différences dans l'état physiologique de la biomasse, et dans la variété du consortium microbien liée à l'augmentation du temps de rétention de boues, ainsi que l'adaptation complète de la biomasse épuratrice aux conditions opératoires utilisées (Vitesse tangentielle 5m/s) pourraient expliquer la similitude dans les concentrations des EPS dans le surnageant des deux bioréacteurs même en présence du cyclophosphamide et ses principaux métabolites. Cependant, ceci n'exclut pas la possibilité que des différences puissent être observées sur la concentration et sur la composition des EPS liées dans les flocs microbiens. Le paragraphe suivant met en évidence des phénomènes de floculation des agrégats microbiens en présence du cyclophosphamide et ses principaux métabolites.

4.2 Influence du cocktail pharmaceutique sur les variations des tailles de flocs.

Nous nous sommes aussi intéressés aux variations possibles de la taille des flocs en présence du cocktail pharmaceutique. La distribution de la taille des flocs a été suivie tout au long de la campagne expérimentale II (Âge de boues 70 jours) et durant les premiers 81 jours pour la campagne I (âge de boues 50 jours). Dans ce paragraphe nous ne nous intéressons qu'au diamètre moyen ($d_{4,5}$) en volume, rapporté dans les figures 4.2.1 (a) et (b) en fonction du temps. Les distributions des tailles de particules seront présentées ultérieurement dans le paragraphe 4.3 où nous discuterons les conséquences des modifications de la liqueur mixte sur le colmatage de la membrane.

Durant la première campagne (Figure 4.2.1(a) âge de boues = 50 jours), nous observons une augmentation du diamètre moyen dès le jour 45 (différence de 15 μm par rapport au BÀM R2 contrôle) jusqu'au jour 74. Cet écart se réduit de manière considérable après l'augmentation de la vitesse tangentielle. Nous supposons que la forte contrainte de cisaillement imposée sur les flocs microbiens entraîne une forte défloculation des agrégats, ainsi la valeur du diamètre moyen du jour 81, étant égale pour les deux bioréacteurs, n'est qu'une conséquence du cisaillement de la pompe de recirculation. Cependant, le phénomène de floculation en présence du cocktail pharmaceutique observé durant une courte durée lors de la première campagne, est mis clairement en évidence lors de la deuxième campagne expérimentale, comme le montre la figure 4.2.1 (b).

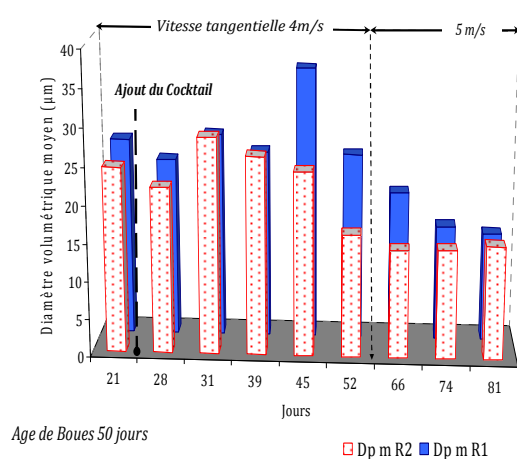


Figure 4.2.1(a) Evolution du diamètre moyen de flocs des deux bioréacteurs (répartition en volume) en fonction du temps. Campagne expérimentale I.

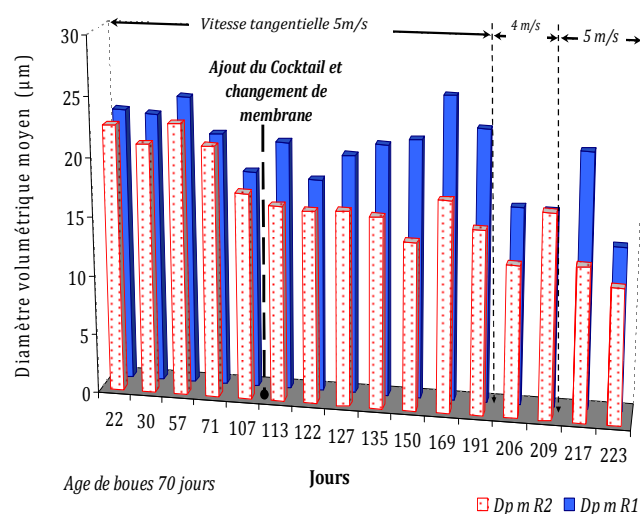


Figure 4.2.1 (b) Evolution du diamètre moyen de flocs des deux bioréacteurs (répartition en volume) en fonction du temps. Campagne expérimentale II.

La figure 4.2.2 suivante montre l'évolution dans le temps du rapport entre les diamètres moyens des bioréacteurs :

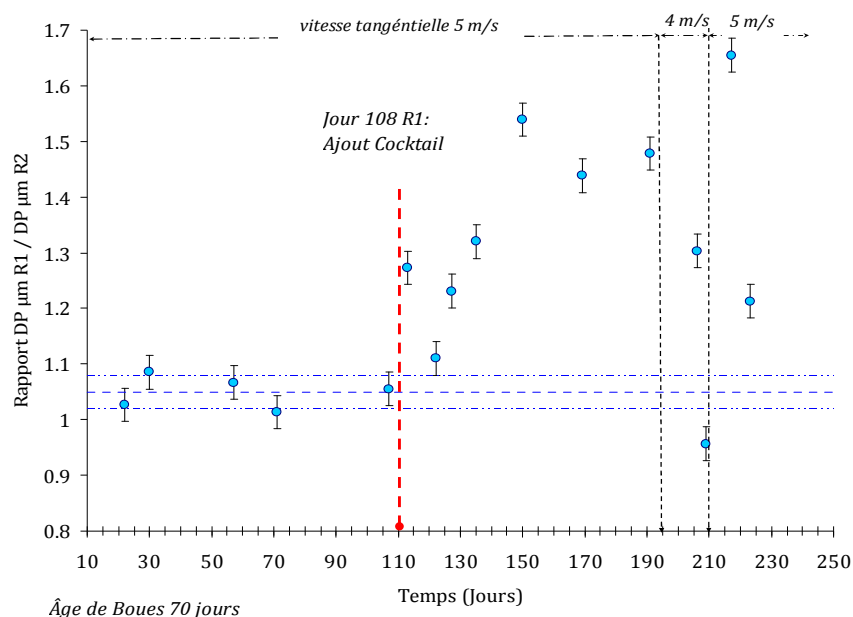


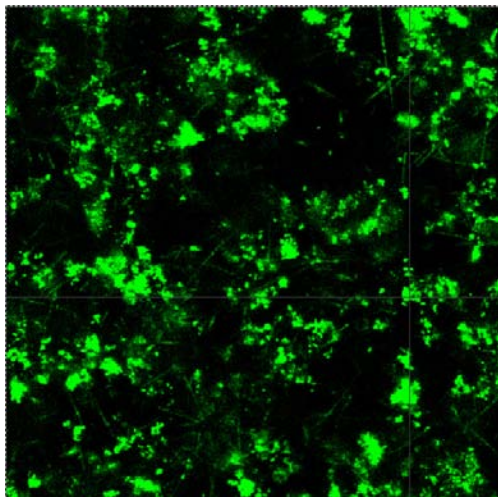
Figure 4.2.2 Evolution dans le temps du rapport entre diamètres moyens des Bioréacteurs : BÂM R1 CP / BÂM R2 contrôle. Campagne expérimentale II.

L'augmentation du diamètre moyenne des flocs dans le BÂM R1 CP par rapport à celui des flocs dans le BÂM R2 contrôle après l'adjonction en continu du cyclophosphamide et ses métabolites au BÂM R1 CP est alors facilement remarquable.

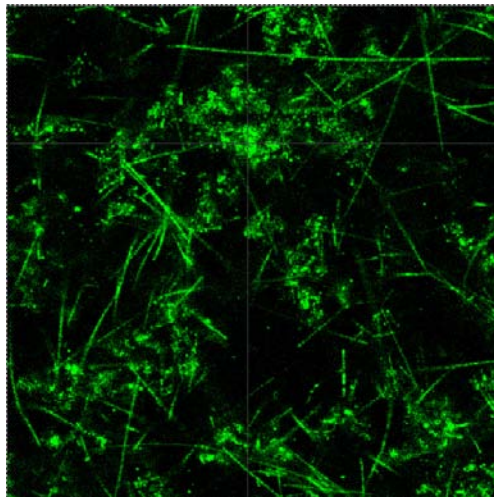
Nous supposons que l'augmentation du diamètre moyen est une conséquence de la production des EPS permettant la formation de flocs de plus grande taille. Henriques et Love (2007) ont signalé que les EPS dans les flocs de boues activées protègent la communauté bactérienne contre les produits chimiques qui interagissent avec la matrice de polymères, en empêchant l'accès du produit chimique jusqu'aux cellules bactériennes. En effet, l'augmentation de la taille des flocs jouerait ainsi un rôle important par rapport à la diffusion des composés pharmaceutiques vers l'intérieur des flocs qui serait alors diminuée.

L'analyse des agrégats a été approfondie par des observations au microscope confocal après marquages, le jour 190 (vitesse tangentielle 5 m/s) et le jour 198 (vitesse tangentielle 4 m/s). Les observations font apparaître plus clairement les différences d'organisation entre les deux types de biomasse. Des colonies plus denses sont observées dans le bioréacteur BÂM R1 CP par rapport

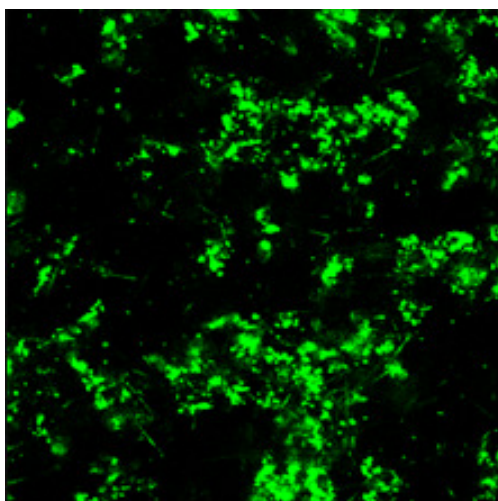
au bioréacteur BÀM R2 Contrôle, pour les deux jours d'analyse, illustrant bien le comportement observé par les analyses de granulométrie.



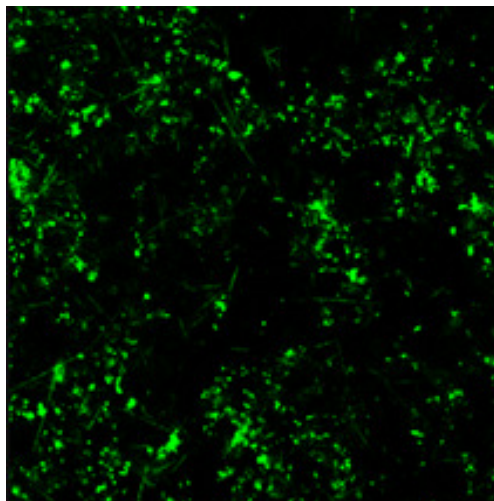
BÀM R1 CP, Jour 190.
Campagne expérimentale II.



BÀM R2 Contrôle, Jour 190.
Campagne expérimentale II.



BÀM R1 CP, Jour 198.
Campagne expérimentale II.



BÀM R2 Contrôle, Jour 198.
Campagne expérimentale II.

***Figure 4.2.3 Observations au microscope confocal des boues issues des deux bioréacteurs.
Campagne expérimentale II.***

4.3 Conséquences des modifications de la liqueur mixte sur le colmatage de la membrane.

Au-delà des conditions opératoires, des caractéristiques de l'alimentation et des caractéristiques du module et de la membrane, les propriétés intrinsèques du milieu biologique ont des conséquences significatives sur le colmatage. Plusieurs paramètres caractérisant la boue activée peuvent influencer le comportement d'une filtration : la fraction solide, colloïdale et soluble ; la concentration en MES, la viscosité de la phase continue, la taille des flocs, l'hydrophobicité et la charge de surface flocs, les EPS liés, la concentration en EPS dans le surnageant (ou produits microbien solubles), etc. (Le-Clech et al., 2006).

En première approche de l'évaluation de l'influence du cyclophosphamide et ses principaux métabolites sur le caractère colmatant d'une boue activée, nous avons basé nos analyses de résultats sur les mesures de la distribution de taille de flocs, la concentration en EPS dans le surnageant et la filtrabilité de la boue (calcul de la résistance spécifique ou du produit αC). Les résultats obtenus seront exposés et discutés séparément pour chaque campagne expérimentale.

4.3.1 Campagne expérimentale I. Âge de boues 50 jours.

L'évolution de la pression transmembranaire dans le temps pour les deux bioréacteurs est montrée sur la figure 4.3.1 (a).

La pression transmembranaire (PTM) suit le même comportement dans les deux bioréacteurs même après l'adjonction du cocktail (CP+métabolites) jusqu'au jour 65. L'augmentation de la PTM du jour 45 au jour 65, sont similaires pour les deux réacteurs, indiquant que le colmatage de la membrane est fortement liée aux conditions opératoires. Afin de diminuer le colmatage des membranes, le jour 65 la vitesse tangentielle le long de la membrane a été augmentée de 4 à 5 m/s. Pour le bioréacteur BÀM R2 contrôle, l'augmentation de la vitesse a permis la diminution du colmatage (la pression se stabilise autour de 0.60 bars). Mais pour le BÀM R1 CP, après une diminution du jour 66 au jour 75, la pression transmembranaire revient à sa valeur précédente de 1.3 bars comme avant le changement de vitesse.

Le jour 114, nous avons changé les membranes des deux BÀM pour deux nouvelles membranes. De cette façon, en plus de réduire la pression transmembranaire, nous voulions déterminer si

l'augmentation de la PTM dans le BÂM R1 CP était plus liée à un colmatage irréversible ou bien d'avantage aux caractéristiques de la liqueur mixte.

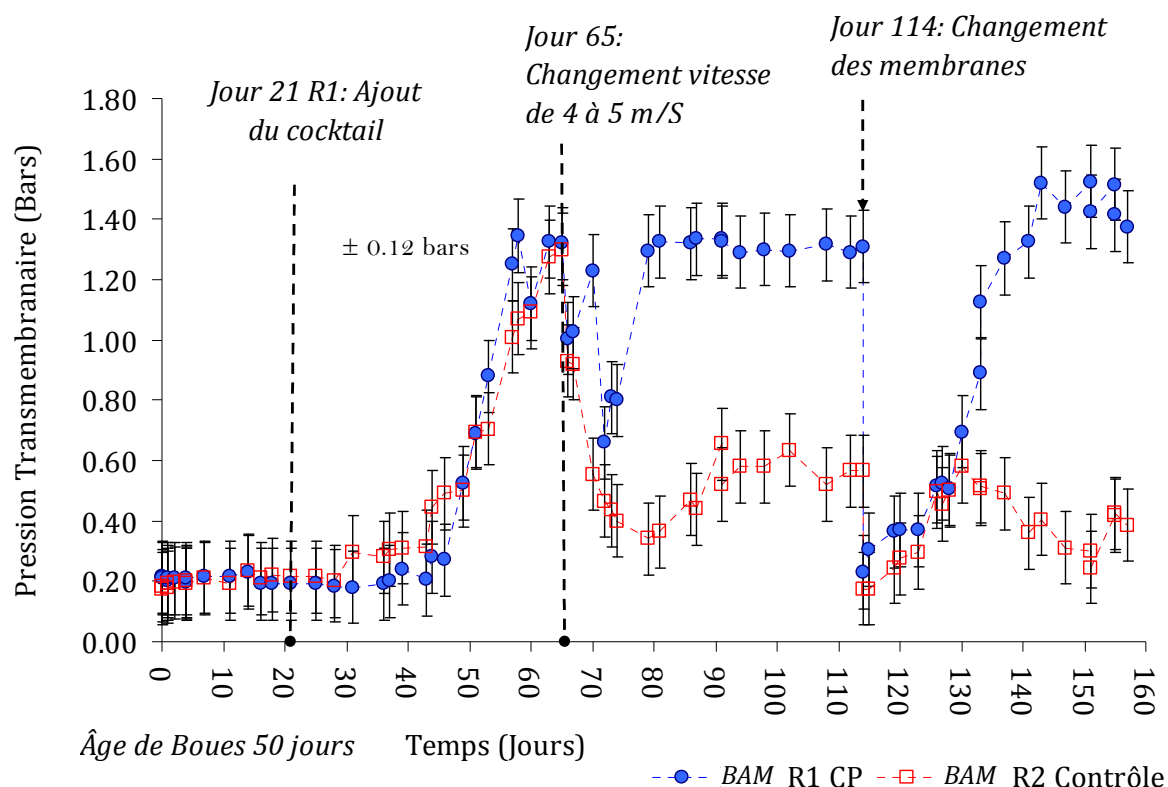


Figure 4.3.1 (a) Campagne expérimentale I.
Evolution dans le temps de la pression transmembranaire des deux bioréacteurs.

Après ce changement, la PTM du BÂM R2 contrôle augmente atteignant la même valeur qu'avant le changement de membrane (0.6 bars) puis elle diminue jusqu'au 0.4 bars. Dans le cas du BÂM R1 CP, la pression transmembranaire augmente de manière considérable jusqu'à une valeur de 1.5 bars (supérieure à celle précédant le changement, 1.3 bars).

Ce résultat met en évidence que la réponse des boues activées au cisaillement imposé est bien différenciée par la présence du cocktail de molécules pharmaceutiques. La boue activée du BÂM R1 CP présente de moins grandes capacités d'adaptation au stress mécanique que celle du BÂM R2 Contrôle. La toxicité du cocktail des composés pharmaceutiques sur la boue activée modifie donc, les caractéristiques de la matrice biologique. Afin de mieux comprendre ces modifications, nous avons observé ponctuellement de la distribution des tailles de flocs dans les deux bioréacteurs. La figure suivante présente les distributions des tailles de flocs des deux bioréacteurs pour les jours 21, 39 et 81 de fonctionnement :

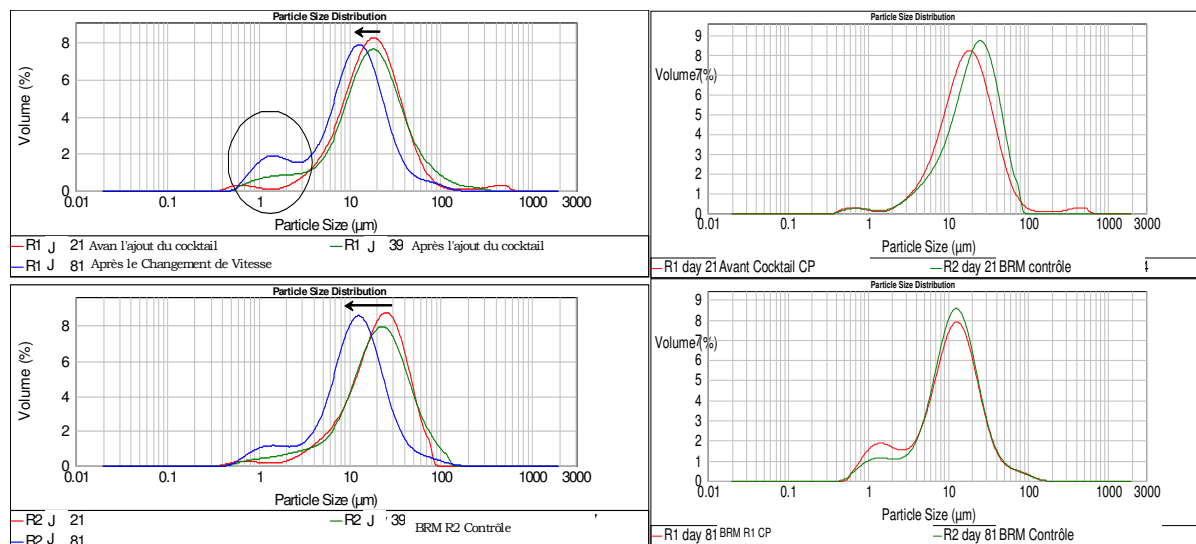


Figure 4.3.1 (b) Distributions des tailles de floes. Jours 21 (avant l'ajout du cocktail), 39 (après l'adjonction du cocktail) et 81 (après le changement de la vitesse tangentielle) de la campagne expérimentale I. A droite, évolution dans le temps pour le B&A M R1 CP (en haut) et pour le B&A M R2 Contrôle (en bas). A Gauche, comparaisons des distributions entre bioréacteurs les jours 21 (en haut) et 81 (en bas). Campagne expérimentale I.

La distribution de la taille des particules de la liqueur mixte des bioréacteurs change après l'augmentation de la vitesse tangentielle. Le diamètre moyen des floes est réduit et la quantité des petites particules augmente. Il est clair que dans la gamme de 0,6-3μm, la fraction de particules plus petites dans le B&A M R1 CP est relativement plus grande que celle dans le B&A M R2 contrôle. Ceci modifie très probablement le caractère colmatant de la boue activée.

Le pouvoir colmatant de la boue des bioréacteurs a été évaluée à différents moments sur les 80 premiers jours de fonctionnement. La figure 5.3.1 (C) compare les produits αC des deux bioréacteurs. Les points correspondent aux prélèvements faits du jour 25 (après l'ajout du cocktail) au jour 80 de fonctionnement.

Il est facilement remarquable que le produit αC de la boue activée du B&A M R1 CP est plus important que celui du B&A M R2 contrôle

Continuant avec notre analyse pour mieux appréhender les conséquences des modifications de la liqueur mixte sur le colmatage de la membrane, nous évaluons, dans le paragraphe suivant, l'apport des exopolymères présents dans le surnageant sur le caractère colmatant de la liqueur mixte.

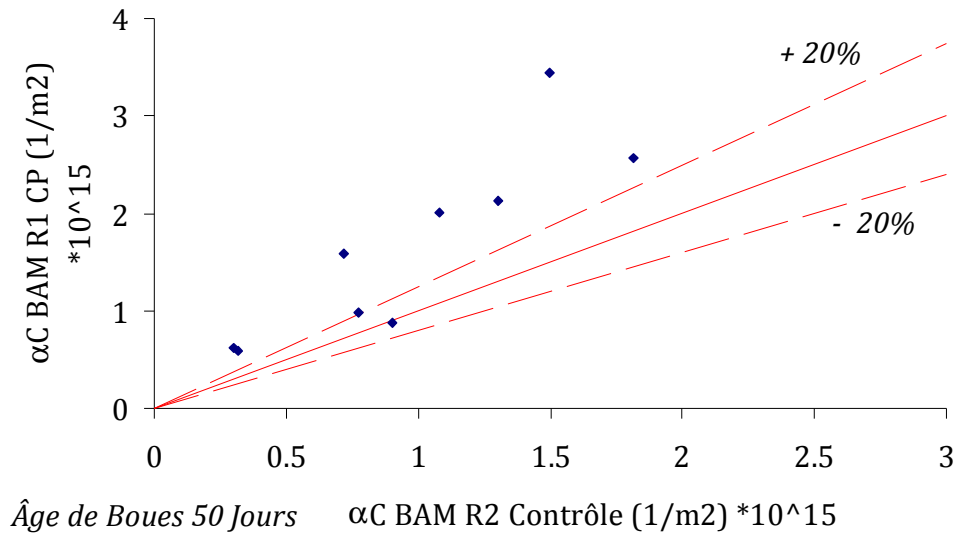


Figure 4.3.1 (c). Campagne expérimental I. Comparaison du pouvoir colmatant de la boue activée des deux bioréacteurs : αC BAM R1 CP en fonction de αC BAM R2 contrôle.

4.3.1.1 Relation entre les exopolymères et le caractère colmatant de la boue activée

La rétention de substances polymériques extracellulaires est importante pour le fonctionnement des bioréacteurs à membrane tant pour la qualité des effluents que pour le colmatage de la membrane. Bien qu'il n'y ait pas de consensus clair sur la nature exacte des phénomènes qui se produisent à l'interface de la membrane au cours de la filtration, de nombreuses publications indiquent que les substances polymériques extracellulaires (EPS) jouent un rôle majeur dans le colmatage (Rosenberger et Kraume, 2002 ; Hernandez Rojas et al., 2005; Nuengjamnong Ch. et al., 2005 ; Bae et Tank, 2005 ; Le-Clech et al., 2006 ; Rosenberger et al., 2006).

Plus précisément, Rosenberger et al., (2005) affirment qu'au cours de la filtration, les produits microbiens solubles (ou EPS solubles) adsorbés sur la surface de la membrane en bloquant les pores et/ou forment un gel sur sa surface, où ils assurent une éventuelle source de nutriments pour la formation d'un biofilm et une résistance hydraulique au flux de perméat.

Afin de comparer le pouvoir colmatant du surnageant des deux réacteurs (obtenu après centrifugation à 5000 tours/min durant 20 minutes), des analyses de filtration ont été effectuées les jours 53, 59, 66 et 80 de fonctionnement durant la campagne expérimentale I, en utilisant la méthode décrite au chapitre 2. La figure 4.3.1 (d) présente l'évolution du produit αC et du facteur MFI du surnageant dans les deux bioréacteurs :

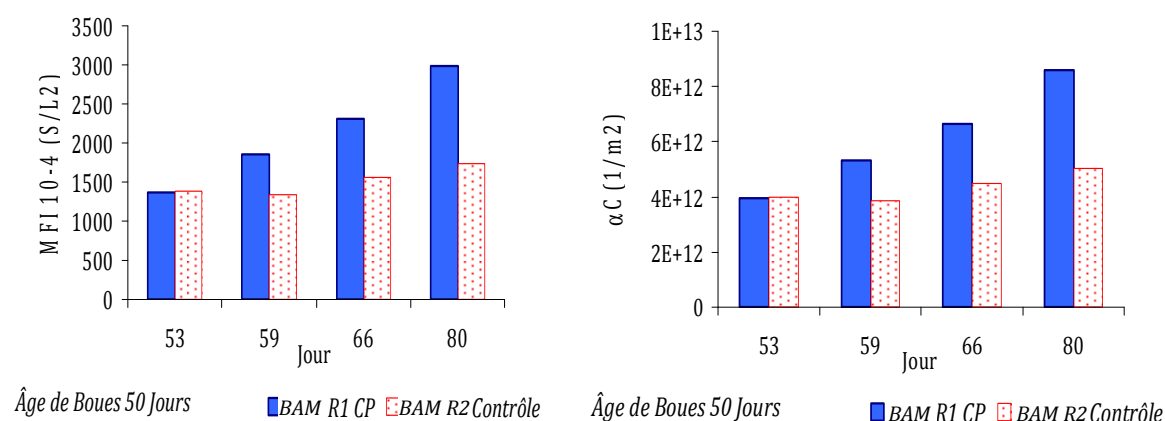


Figure 4.3.1 (d) Evolution du produit αC et du facteur MFI du surnageant dans les deux réacteurs en fonction du temps durant les 80 premiers jours de fonctionnement. Campagne expérimentale I.

Nous observons que le produit αC et le facteur MFI du BÀM R1 CP est supérieur à celui du surnageant du BÀM R2 contrôle. Le surnageant (composé de matières colloïdale et soluble) du BÀM R1 CP présente une aptitude au colmatage plus élevé que celle du BÀM R2 contrôle.

Selon nos résultats précédents et la bibliographie, on peut s'attendre à ce que la concentration en exopolymères solubles joue un rôle important dans le colmatage. La figure 4.3.1 (e) compare l'évolution du produit αC du surnageant selon la concentration en exopolymères solubles, pour les deux bioréacteurs.

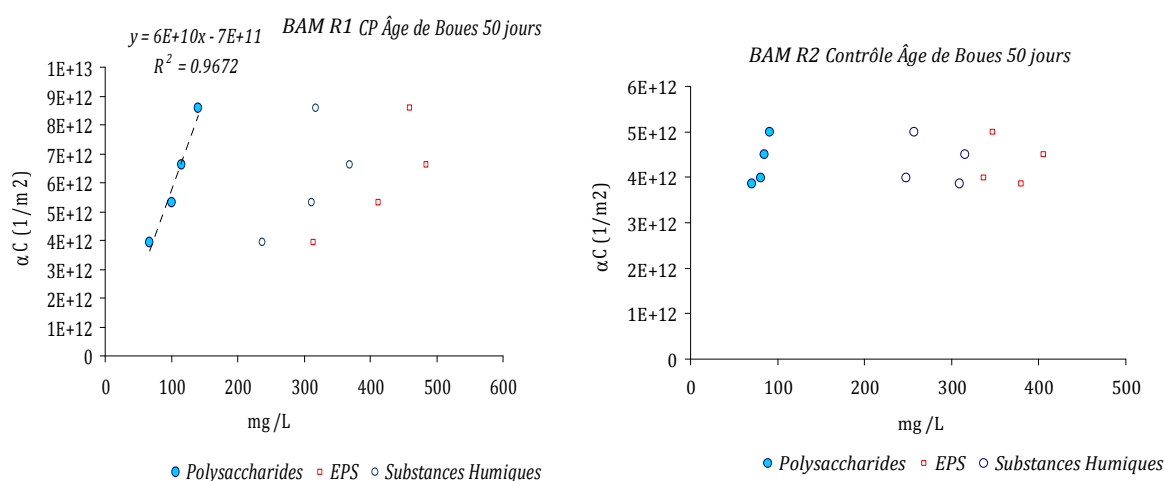


Figure 4.3.1 (e) Evolution du produit αC du surnageant des deux bioréacteurs en fonction de la concentration en exopolymères solubles. Prélèvements faits les jours 53, 59, 66, 80 durant la Campagne expérimentale I. A gauche BÀM R1 CP. A droite BÀM R2 Contrôle.

D'après ces figures, le produit αC du surnageant est plus étroitement lié à la concentration en polysaccharides, car ceci est le seul paramètre pour lequel nous pouvons associer une relation linéaire. En outre, ce lien est plus évident dans le BÀM R1 CP que dans le BÀM R2 contrôle.

Nous nous sommes aussi intéressés à la relation entre la concentration en polysaccharides et le pouvoir colmatant de la boue (pas seulement le surnageant). La figure 4.3.1 (f) montre les évolutions de la concentration en polysaccharides et du produit αC de la boue en fonction du temps pour les deux bioréacteurs durant les 80 premiers jours de fonctionnement. De même, cette figure montre la relation entre la concentration en polysaccharides solubles et le produit αC de la boue activée. Nous observons clairement pour les deux bioréacteurs que l'évolution de la concentration en polysaccharides solubles est semblable à celle du produit αC de la boue activée. Toutefois, le rapport entre ces deux paramètres est plus étroit dans le BÀM R1 CP où le coefficient de corrélation linéaire est de $R^2 = 0.9441$ (et de $R^2 = 0.7881$ dans le BÀM R2 contrôle).

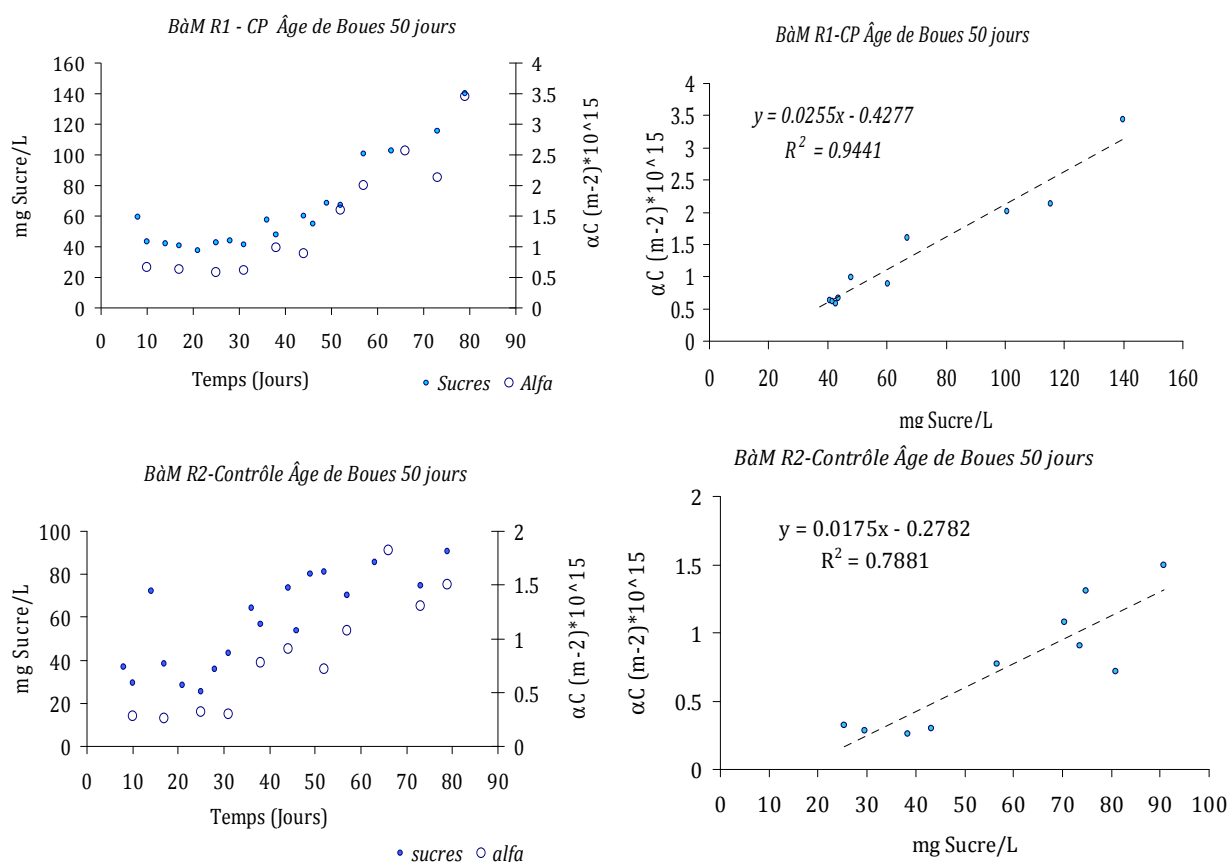


Figure 4.3.1 (f) à gauche, Evolution de la concentration en polysaccharides et du produit αC de la boue en fonction du temps pour les deux bioréacteurs durant les 80 premiers jours de fonctionnement. A droite, relation entre la concentration en polysaccharides solubles et le produit αC de la boue activée.

4.3.1.2 Discussion (Colmatage-Campagne expérimentale I)

D'après Wisniewski et Grasmick (1998), les conditions hydrodynamiques (cisaillement, pression,) ou biologiques (température, pH, concentration en éléments nutritifs, etc) qui modifient le comportement biologique de la suspension et, par conséquent, la quantité des éléments solubles (polysaccharides, des phospholipides, des protéines, etc) peuvent jouer un rôle important sur le colmatage de la membrane.

L'influence des conditions hydrodynamiques dans un bioréacteur à membrane externe sur la liqueur mixte et sur le colmatage de la membrane a déjà été étudié au préalable. En effet, dans une autre étude menée par Wisniewski et al. (2000), il est démontré qu'une augmentation de la vitesse de recirculation de la boue activée, dans un bioréacteur à membrane externe (flux tangentiel) induit une diminution dans la distribution de la taille des floccs, conduisant alors à différentes intensités de colmatage. Ils affirment que l'augmentation du pouvoir colmatant de la boue s'explique par un relargage de fines particules et d'exopolymères dû à l'augmentation des contraintes de cisaillement sur la boue. De la même façon Kim Jae-Seok et al., (2001) ont étudié l'influence du cisaillement imposé par le pompage sur les performances d'un bioréacteur à membrane externe (flux tangentiel). Lorsque le cisaillement par la pompe est imposé aux cellules, des EPS sont libérés par les cellules vers la liqueur mixte. Ils signalent que l'augmentation de la résistance spécifique de la liqueur mixte et du surnageant pourrait être en partie due à la réduction de la taille des floccs et en partie à la libération des EPS depuis les floccs vers la liqueur mixte. Dans notre étude, ces phénomènes ont été observés après l'augmentation de la vitesse tangentielle de 4 m/s à 5 m/s. Cependant, bien que les contraintes de cisaillement imposées aient été les mêmes pour les deux bioréacteurs, l'ampleur de ces phénomènes et les conséquences sur le colmatage de la membrane n'ont pas été les mêmes. Le colmatage a été plus important dans le bioréacteur à membrane en présence du cyclophosphamide et de ses principaux métabolites (BàM R1 CP) que dans le bioréacteur contrôle (BàM R2 Contrôle).

Par ailleurs, il est généralement accepté que les substances polymériques extracellulaires (EPS) comprennent principalement des polysaccharides solubles, des protéines solubles et des substances humiques. Jusqu'à présent, l'apport au colmatage de chaque composant est encore un sujet de recherche controversé. Certains auteurs attribuent majoritairement le colmatage aux protéines (Massé, 2004 ; Hernandez Rojas et al., 2005 ; Meng et al., 2006). Des études récentes ont signalé les polysaccharides solubles comme un des principaux composés influençant le

colmatage de la membrane (Lesjean et al., 2005 ; Rosenberger et al., 2005, 2006 ; Zhang et al., 2006 ; Vocks et al., 2006 ; Drews et al., 2006 ; Le Clech P. et al., 2006, 2007 ; Thanh et al., 2008 ; Nataraj et al., 2008).

Dans notre étude, nous avons observé que la présence de composés pharmaceutiques (Cyclophosphamide et métabolites) stimule les mécanismes de survie et de production des EPS des bactéries avec une production plus marquée des polysaccharides. L'influence des polysaccharides solubles sur le colmatage de la membrane a été mise en évidence récemment. Drews et al (2006) ont attribué la tendance générale de l'augmentation du colmatage des membranes dans des conditions instables du réacteur à la situation de stress pour une biomasse sécrétant des polysaccharides spéciaux avec un potentiel inhérent au colmatage. Dans une autre étude, Rosenberger et al., (2006) ont notamment démontré une corrélation linéaire entre la concentration en polysaccharides et une augmentation de la résistance à la filtration.

Le caractère colmatant des polysaccharides semble être lié à leur tendance à former des couches de gel sur la surface de la membrane filtrante. Lapasin et al (1995) affirment qu'un certain nombre de polysaccharides naturels ont été identifiées comme étant capables de former un gel dans des conditions particulières (Lapasin et al., 1995). Laurent et Junter (1994) ont montré des limitations du transfert de matière dans des solutions contenant des polysaccharides macromoléculaires. Par conséquent, ces composés dans la phase liquide sont essentiels pour leur participation potentielle à l'accumulation dans la couche limite et, par conséquent, la formation de couche à caractère colmatant (phénomène de polarisation). Dans deux autres études, les analyses sur la couche de colmatage ont aussi révélé une concentration plus élevée en glucides et une concentration plus faible en protéines par rapport à leurs niveaux dans la liqueur mixte [Chu et Li, 2005 ; Zhang et al., 2006]

Wang et Waite (2008) ont étudié la rétention des produits microbiens solubles dans un bioréacteur à membrane immergée. Des filtrations frontales à flux constant du surnageant de la boue d'un bioréacteur à membrane ont été effectuées. Ces résultats montrent que le colmatage de la membrane durant la filtration est étroitement lié à la rétention de substances polymériques extracellulaires solubles par la membrane à travers la formation d'une couche de gel. Toutefois, la structure de la couche de gel est principalement constituée de polysaccharides, qui contrôlent sa perméabilité. Les protéines semblent être prises au piège dans la couche de gel par des effets stériques et/ou d'adsorption, mais elles jouent un rôle minime dans la structure du gel. Le mécanisme proposé pour la rétention par adsorption pourraient découler des attractions

électrostatiques intermoléculaires ou par complexations chimiques impliquant des ions métalliques. En outre, la couche de gel est généralement très compressible (Wang et Waite, 2008b). Les auteurs avancent que l'augmentation de la pression transmembranaire nécessaire pour maintenir un flux constant lors de la filtration membranaire (comme dans notre étude) causée par le colmatage progressif comprime la couche de gel formée, ce qui entraîne une réduction de la taille de canaux permettant le passage d'eau. Avec la diminution de la taille des canaux, on s'attend à ce que de plus en plus de particules colloïdales y compris les protéines pourraient ne pas être en mesure de passer à travers la couche de gel en raison de l'exclusion par taille. Selon cette affirmation, dans le cadre de notre étude, nous pourrions supposer que les substances humiques seraient aussi adsorbées ou simplement retenues par la couche de polysaccharides. Ceci expliquerait l'augmentation de la rétention des substances humiques par la membrane observée lorsque le colmatage devient plus important (figure 4.1.1.4).

D'après la littérature et nos résultats, nous pouvons avancer que la production des EPS solubles induite par la présence de toxiques (production de polysaccharides) et leur accumulation et ainsi que la formation de petites particules sont à l'origine de l'augmentation de la résistance à la filtration. Ainsi le colmatage est plus important dans le BÀM R1 CP par rapport au BÀM R2 contrôle. Le changement de membrane (équivalent à un nettoyage chimique de celle colmatée) n'a rien changé par rapport à la pression transmembranaire. Ainsi, la qualité des boues (taille de flocs), leur résistance au stress mécanique (qui a été affaiblie par les cytostatiques) et la surproduction des polysaccharides, influent sur l'amplitude du colmatage dans le bioréacteur BÀM R1 CP.

4.3.2 Campagne Expérimentale II. Âge de boues 70 jours.

La figure 4.3.2 (a) présente l'évolution de la pression transmembranaire (PTM) des deux pilotes durant cette campagne expérimentale.

Une période d'adaptation aux conditions opératoires (âge de boues, TSH, et surtout la vitesse tangentielle 5 m/s) a été respectée durant cette campagne expérimentale (108 jours, environ 1.5 fois l'âge de boue). Il est remarquable qu'après le jour 50 et jusqu'au jour 108, l'évolution de la PTM pour les deux bioréacteurs est fortement similaire, y compris avec des variations à attribuer uniquement au procédé ou à l'effluent. Le jour 111, nous avons changé les membranes pour assurer les mêmes conditions de filtration pour les deux bioréacteurs à membrane. Après l'ajout

du cocktail des composés pharmaceutiques (Jour 108), peu de différences sont observées entre les deux bioréacteurs. La pression transmembranaire restant stable et faible, le jour 192 nous avons voulu diminuer la vitesse tangentielle le long de la membrane à 4 m/s pour étudier la réaction des bioréacteurs à des nouvelles conditions de filtration. Puis le jour 210, la vitesse a été remise à 5m/s. Curieusement, le jour 206 et ce jusqu'au jour 209 la pression transmembranaire dans le BÀM R1 CP chute par rapport au BÀM R2 Contrôle. La valeur de la PTM résultante est de 0.5 bars (avant le changement de vitesse elle était de 0.32 bars) bien que pour le BÀM R2 contrôle la PTM soit de 1.40 bars. Encore une fois, ce résultat met en évidence que les caractéristiques de la boue activée en présence de composés pharmaceutiques ne sont pas les mêmes que celles du BÀM R2 contrôle.

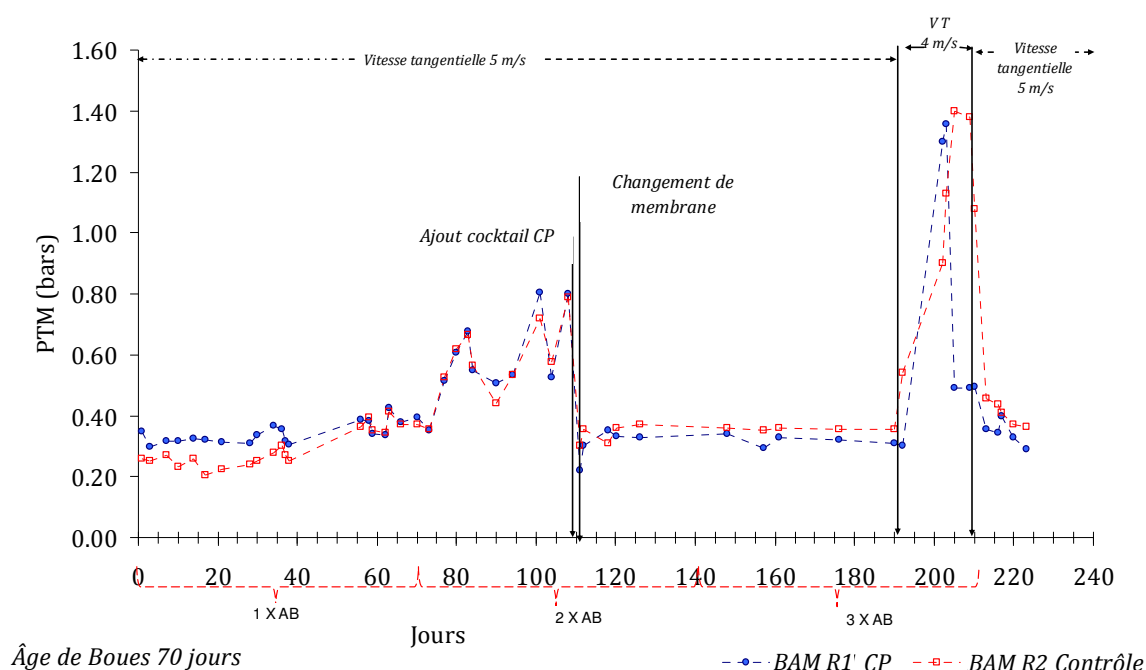


Figure 4.3.2 (a) Evolution dans le temps de la pression transmembranaire des deux bioréacteurs. Campagne expérimentale II. AB= âge de Boues

Afin de comprendre ce phénomène, nous allons aborder en premier lieu les influences potentielles de la rétention d'EPS dans la surnageant sur la membrane. Telles que nous les avons déjà observées (figures 4.1.2.1, 4.1.2.2, 4.1.2.3), les variations des concentrations en EPS dans les surnageants des bioréacteurs sont similaires.

La figure 4.3.2 (b) montre le pourcentage de rétention des substances humiques et de polysaccharides par la membrane dans les deux bioréacteurs au cours de la campagne expérimentale.

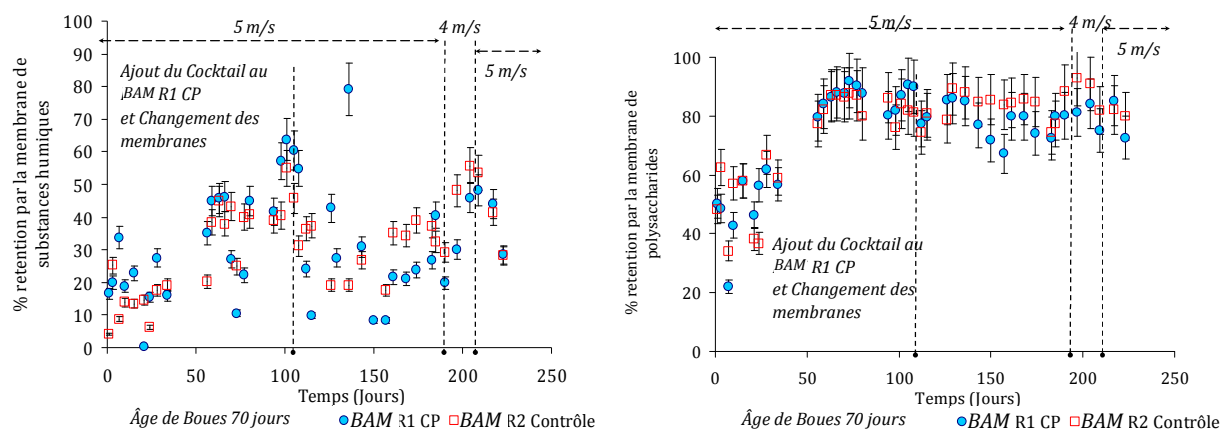


Figure 4.3.2 (b) Campagne expérimentale II. Evolution du pourcentage de rétention par la membrane des substances humiques (à gauche) et des polysaccharides (à droite) dans le temps pour les des deux bioréacteurs.

Les comportements sont, encore une fois, similaires pour les deux bioréacteurs. La rétention par la membrane des substances humiques (Figure 4.3.2b) suit l'évolution de la pression transmembranaire (Figure 4.3.2a ; pour plus de détail, voir l'annexe 8), tandis que la rétention des polysaccharides reste supérieure à 80% dès le jour 59 de fonctionnement.

Comparons maintenant le pouvoir colmatant des boues activées. Rappelons que ce paramètre est obtenu par un essai annexe au pilote. Dans la figure 4.3.2 (c) nous traçons le produit αC de la boue activée du BÀM R2 contrôle en fonction du produit αC de la boue activée du BÀM R1 CP. Les symboles carrés correspondent aux prélèvements faits du jour 2 au jour 71 de fonctionnement, avant l'ajout du cocktail. Les symboles ronds correspondent aux prélèvements faits du jour 115 au jour 224 de fonctionnement, après l'ajout du cocktail.

Avant l'ajout du cocktail, le pouvoir colmatant des boues des deux bioréacteurs sont similaires. Par contre, après l'adjonction du cyclophosphamide et ses principaux métabolites, le produit αC de la boue du BÀM R1 CP est inférieur à celui du BÀM R2 contrôle. Dans les nouvelles conditions opératoires, l'adjonction du cocktail contenant des composés pharmaceutiques diminue le pouvoir colmatant de la suspension filtrante, au contraire de la campagne expérimentale I.

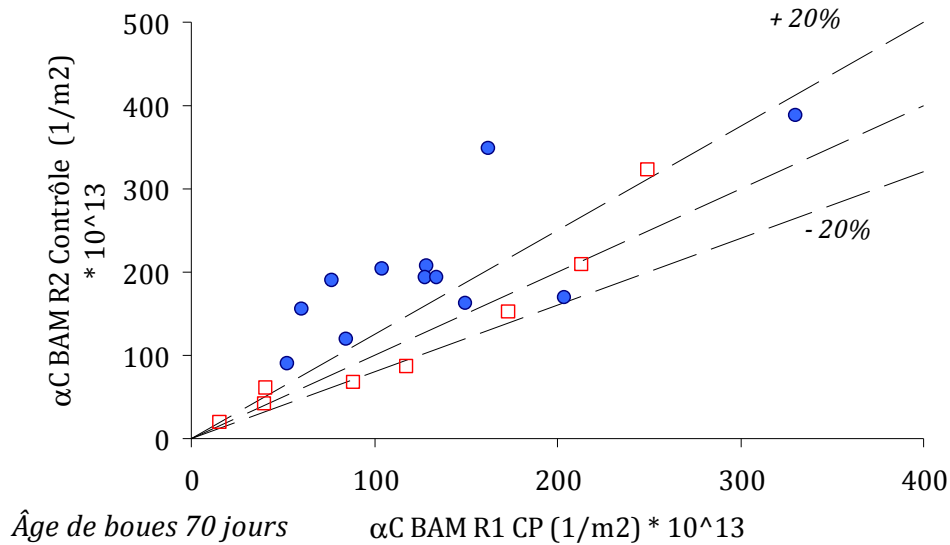


Figure 4.3.2 (c) Comparaison du pouvoir colmatant de la boue activée des deux bioréacteurs : αC BÀM R2 contrôle en fonction de αC BÀM R1 CP. prélèvements faits du jour 2 au jour 71 de fonctionnement, avant l'ajout du cocktail. \circ prélèvements faits du jour 115 au jour 224 de fonctionnement, après l'ajout du cocktail. Campagne expérimentale I.

La figure 4.3.2 (d) présente l'évolution du produit αC de la boue activée des deux bioréacteurs en fonction du temps.

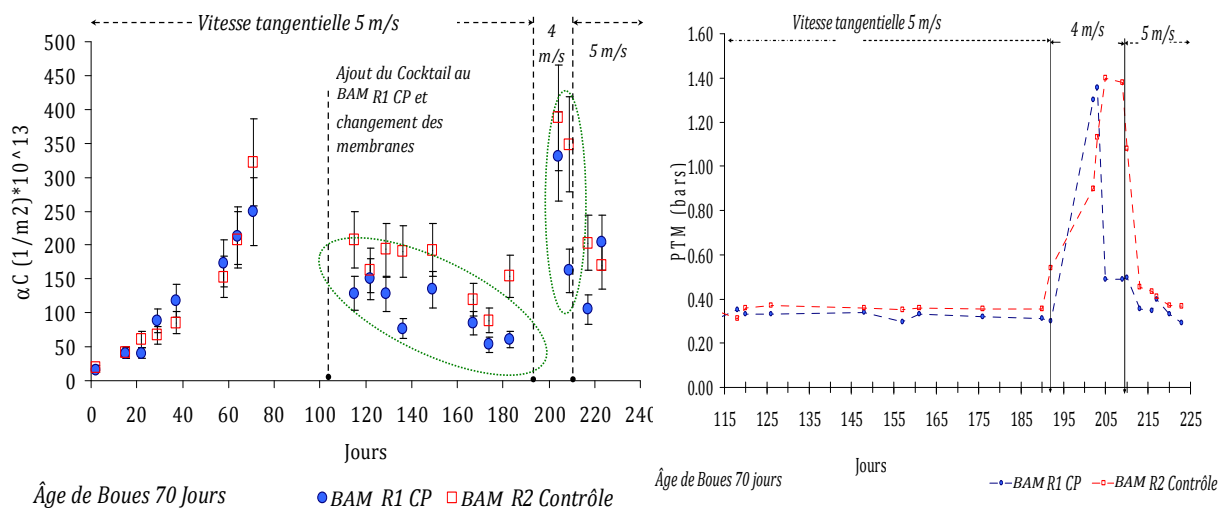


Figure 4.3.2 (d) Evolution du produit αC de la boue activée des deux bioréacteurs en fonction du temps. Campagne expérimentale II.

Tel que nous l'avons déjà montré, l'évolution du produit αC des boues activées des deux bioréacteurs est très similaire pour la période avant l'ajout du cocktail. Il est aussi remarquable, qu'après l'adjonction des composés pharmaceutiques, le produit αC suit le même comportement. Néanmoins, les valeurs correspondant aux BÀM R1 CP sont toujours inférieures à celles du BÀM R2 contrôle. En outre, nous remarquons que pendant la période où la vitesse tangentielle a été diminuée à 4m/s, nous observons la même chute pour la pression transmembranaire le jour 209 et sur la valeur du produit αC .

Le jour 210 nous avons remis la vitesse tangentielle à 5m/s afin d'évaluer l'influence du cisaillement imposé sur la boue activée (confirmer les effets observés durant la première campagne après l'augmentation de la vitesse tangentielle le long de la membrane). Pendant cette période, nous ne pouvons qu'observer une diminution de la pression transmembranaire atteignant des valeurs similaires à celles avant les changements de la vitesse tangentielle. Malheureusement, le temps a été trop court entre la remise de la vitesse tangentielle à 5m/s et l'arrêt des bioréacteurs pour une observation adéquate des conséquences suite à cet événement.

Dans le but de mieux comprendre les modifications observées sur le pouvoir colmatant de la boue activée, nous avons aussi suivi l'évolution de la distribution des tailles de floccs dans les deux bioréacteurs durant le jour 191 (vitesse tangentielle égale à 5m/s) et les jours 206 et 209 où la vitesse tangentielle est égale à 4m/s. Les distributions des tailles de floccs sont présentées sur la figure 4.2.3 (e).

Le jour 191, les distributions sont similaires avec un léger décalage de la distribution du BÀM R1 CP vers des tailles de particules plus grandes. L'écart se creuse le jour 206 où la distribution du BÀM R2 contrôle est plus dispersée et décalée vers des tailles de floccs plus petites. Toutefois, le jour 209, les diamètres moyens sont similaires de l'ordre de 17 μ m dans les deux réacteurs. La différence réside alors sur une population de micro-floccs de taille comprise entre 0.5 μ m et 4 μ m dans la suspension du BÀM R2 Contrôle.

Nous avons déjà évoqué dans les paragraphes précédents l'influence des particules de petite taille sur le pouvoir colmatant d'une boue activée. Dans ce cadre, nous pouvons donc attribuer les différences sur le pouvoir colmatant (produit αC) entre les boues des bioréacteurs à une fraction plus abondante de micro-floccs de petite taille dans le BÀM R2 contrôle que dans le BÀM R1 CP.

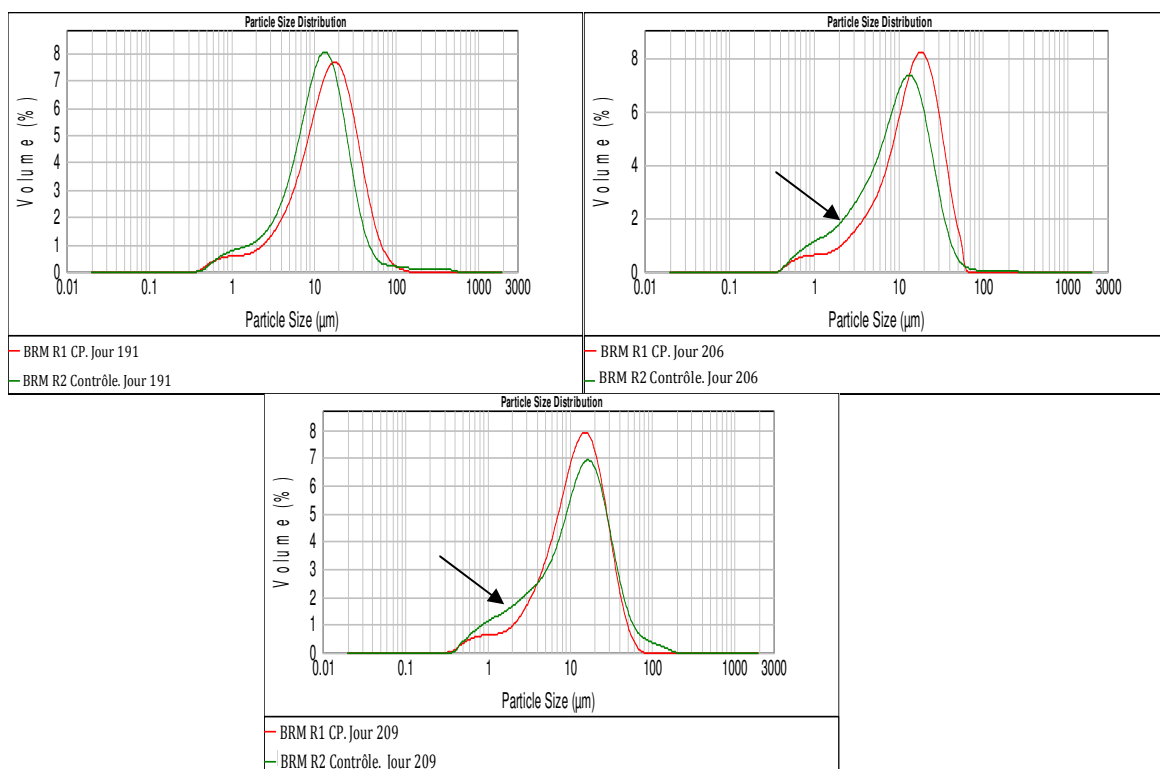


Figure 4.3.2 (e) Distributions des tailles de floccs. Jours 191 (vitesse tangentielle égale à 5m/s), 206 (vitesse tangentielle égale à 4 m/s) et 209 (vitesse tangentielle égale à 4m/s) de la campagne expérimentale II.

4.3.2.1 Discussion (Colmatage-Campagne expérimentale II)

Le rôle des EPS pour les micro-organismes le plus souvent proposé est de nature protectrice vis à vis de son environnement. Du fait des limitations diffusionelles, il est souvent mis en avant que les microorganismes sont mieux protégés des molécules toxiques du fluide lorsqu'ils sont regroupés dans les agrégats denses. Henriques et al. (2005) ont déjà mis en évidence le rôle de la taille des agrégats sur la diminution de l'inhibition causée par des composés toxiques. Ils affirment que les procédés de boue activée qui entraînent la formation de plus petits agrégats sont plus sensibles à l'inhibition de la respiration par les composés solubles toxiques, comparés aux procédés où la taille des agrégats est plus grande. Dans notre étude, la production des EPS liés comme mécanisme de protection aux composés pharmaceutiques étudiés, est mise en évidence par l'augmentation du diamètre moyen de floccs, diminuant donc, la fraction correspondante à la population des particules de petites tailles. De ce fait, le caractère colmatant de cette boue est moins prononcé que celui de la boue activée du BÀM R2 contrôle.

4.4 Synthèse et conclusion

Ce chapitre a permis d'étudier l'influence du Cyclophosphamide et ses principaux métabolites sur les propriétés physico-chimiques de la liqueur mixte et sur le caractère colmatant de la boue activée. Pour chaque bioréacteur nous avons évalué d'une part le colmatage à partir de l'évolution de la pression transmembranaire, et d'autre part le potentiel colmatant par des mesures de la résistance spécifique. Nous avons relié ces paramètres aux propriétés des fluides biologiques, plus précisément aux concentrations en EPS solubles et à la distribution de taille de floccs.

Les analyses réalisées sur le surnageant et sur la boue activée des bioréacteurs nous permettent de proposer les conclusions suivantes :

Campagne expérimentale I. Âge de boue 50 jours :

- La toxicité du cocktail des composés pharmaceutiques sur la boue activée modifie les caractéristiques de la matrice biologique. Les résultats mettent en évidence que la réponse des boues activées des BÂM au cisaillement imposé n'est pas la même : la boue activée du BÂM R1 CP présente des capacités d'adaptation aux stress mécanique moins robustes que celle du BÂM R2 Contrôle.
- La présence du Cyclophosphamide et ses principaux métabolites stimule les mécanismes de survie et de production des EPS (une masse moléculaire de 18.000 Da pour les protéines et à 6000 Da pour les polysaccharides) avec une production légèrement plus forte des polysaccharides que des protéines. L'approche Infrarouge a montré que la réponse globale IR des EPS peut être décrite comme la combinaison de trois espèces chimiques majoritaires : des polysaccharides, des amides ou des amines et des nitrates, respectivement.
- L'accumulation des EPS (production de polysaccharides) et la formation de petites particules est à l'origine de l'augmentation de la résistance à la filtration. Le pouvoir colmatant semble être lié plus étroitement aux polysaccharides influençant autant les propriétés de filtrabilité des boues et du surnageant. De ce fait le colmatage a été plus rapide dans le BÂM R1 CP que dans le BÂM R2 contrôle. La qualité des boues, sa

résistance au stress mécanique (qui a été affaiblie par les cytostatiques) et la surproduction des polysaccharides régissent les phénomènes colmatage dans le bioréacteur BÀM R1 CP.

Campagne expérimental II. Âge de boue 70 jours :

- Les analyses des agrégats par des observations au microscope confocal et par granulométrie réalisées sur la matrice biologique montrent des colonies plus denses dans le bioréacteur BÀM R1 CP par rapport au bioréacteur BÀM R2 Contrôle, après l'ajout du cocktail.
- La production des EPS liés comme mécanisme de protection aux composés pharmaceutiques étudiés, est associée à l'augmentation du diamètre moyen de floes, diminuant donc, la population des tailles de particules petites. De ce fait, le caractère colmatant de cette boue est moins prononcé que celui de la boue activée du BÀM R2 contrôle. Dans les nouvelles conditions opératoires (campagne II), l'adjonction du cocktail contenant des composés pharmaceutiques diminue le pouvoir colmatant de suspension filtrante.

Bien que l'ajout des molécules toxiques entraîne une augmentation du pouvoir colmatant lors de la campagne expérimentale I, une diminution du même paramètre (produit αC) de la liqueur mixte est observée durant la deuxième campagne. Des différences dans l'état physiologique de la biomasse, et la variété du consortium microbien liées à l'augmentation du temps de rétention de boues, ainsi que l'adaptation complète de la biomasse épuratrice aux conditions opératoires utilisées (Vitesse tangentielle 5m/s) pourrait expliquer la différence observée de la réponse de la boue activée en présence du cyclophosphamide et de ses principaux métabolites.

Finalement nous pouvons penser que la défloculation engendrée par les contraintes de cisaillement lors de la première campagne expérimentale a mis en évidence des phénomènes qui se produisent à niveaux des floes (EPS liés), devenant ainsi mesurables par nos techniques analytiques employées et leurs conséquences plus facilement remarquables sur le procédé (colmatage de la membrane). Etant donné que les micro-organismes se sont favorablement adaptés aux contraintes de cisaillement correspondant à une vitesse tangentielle de 5m/s lors de la deuxième campagne expérimentale, les phénomènes de défloculation n'ont pas eu lieu. De ce fait, nous n'avons pas pu apprécier facilement les phénomènes ayant lieu dans les floes. Pour des

recherches ultérieures il serait indispensable de mettre en place aussi les techniques de dosage des substances polymériques extracellulaires liées et le calcul de la dimension fractale.

Les résultats des deux campagnes mettent en évidence le rôle des substances polymériques extracellulaires, plus précisément des polysaccharides, et la présence de particules de petite taille (entre 0.3 et 5 μ m) sur le pouvoir colmatant de la boue activée recirculée dans un bioréacteur à membrane externe.

Chapitre V

Performance d'un bioréacteur à membrane externe pour l'élimination du Cyclophosphamide et de la toxicité liée à ses principaux métabolites

Introduction

Dans ce chapitre nous présentons les résultats des deux campagnes expérimentales concernant l'élimination du cyclophosphamide, ainsi que la réduction de la toxicité liée à ses principaux métabolites. Nous avançons l'hypothèse que des âges de boues importants pourraient jouer un rôle primordial sur la capacité épuratrice des bioréacteurs à membrane concernant en particulier les micropolluants (Cf chapitre I). De ce fait, nous avons étudié deux âges de boues élevés afin d'améliorer l'élimination de ces molécules.

Pour les deux campagnes expérimentales, la concentration à l'entrée ($C_{CP, \text{entrée}}$, ng/L) du BAM R1 CP en cyclophosphamide est calculée à partir de la concentration mesurée par HPLC/MS/MS dans le cocktail préparé en aval (cocktail préparé dans des tubes eppendorf, Cf chapitre II). Cette façon de procéder permet de moins subir les effets des erreurs des différentes étapes analytiques (lyophilisation, extraction, injection) :

$$C_{CP, \text{entrée}} = C_{CP, \text{eppendorf}} \cdot \frac{1}{1000} \cdot \frac{V_{\text{eppendorf}}}{V_{\text{Solution Viadox}}} \cdot \frac{Q_{\text{solution viadox}}}{(Q_{\text{solution viadox}} + Q_{\text{Eau Brax}})}$$

$$Q_{\text{Solution Viadox}} + Q_{\text{Eau Brax}} = Q_{\text{Perméat}}$$

Avec,

$C_{CP, \text{eppendorf}}$:	Concentration en Cyclophosphamide dans le cocktail (ng/L)
$V_{\text{eppendorf}}$:	Volume total du cocktail contenu dans le tube eppendorf (μL)
$V_{\text{solution Viadox}}$:	Volume total de la solution Viadox (mL)
$Q_{\text{Solution Viadox}}$:	Débit d'alimentation de la solution Viadox (L/J)
$Q_{\text{Eau Brax}}$:	Débit d'alimentation des eaux résiduaires de Brax (L/J)
$Q_{\text{perméat}}$:	Débit de perméat (L/J)

5.1 Performance du bioréacteur à Membrane BAM-R1-CP pour l'élimination du Cyclophosphamide.

Les figures 5.1.1 (a) et (b) présentent l'évolution de la concentration en CP à l'entrée, dans le surnageant et dans le perméat du bioréacteur BAM R1 CP au cours du temps durant les campagnes expérimentales I et II, respectivement.

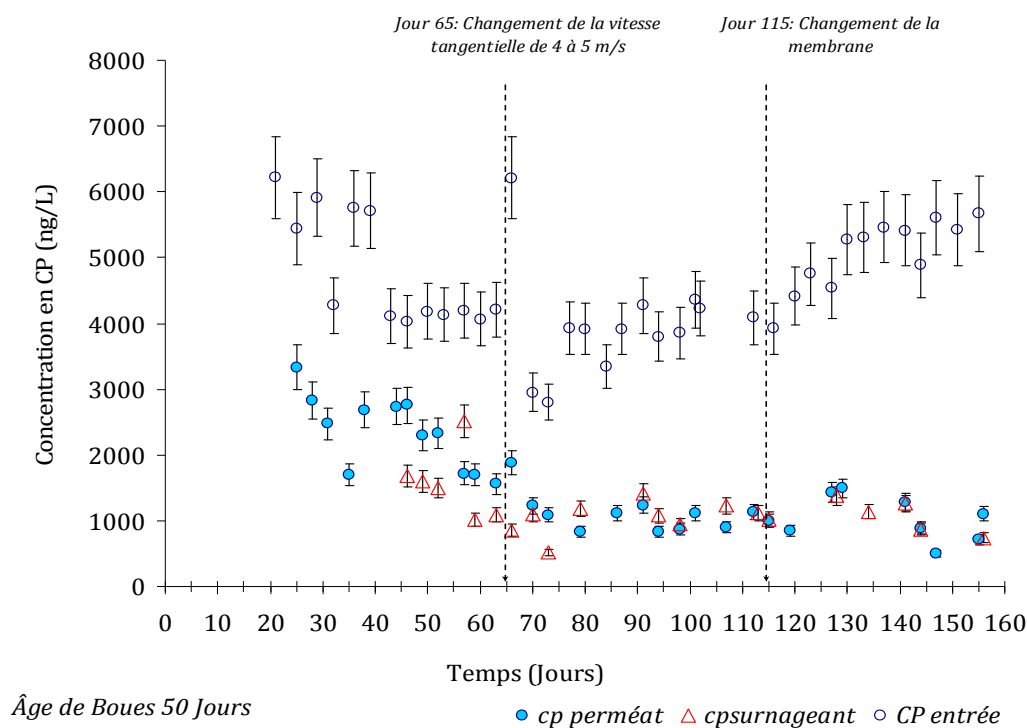


Figure 5.1.1(a) Evolution de la concentration en CP à l'entrée, dans le surnageant et dans le perméat du bioréacteur BAM R1 CP dans le temps durant la campagne expérimentale I.

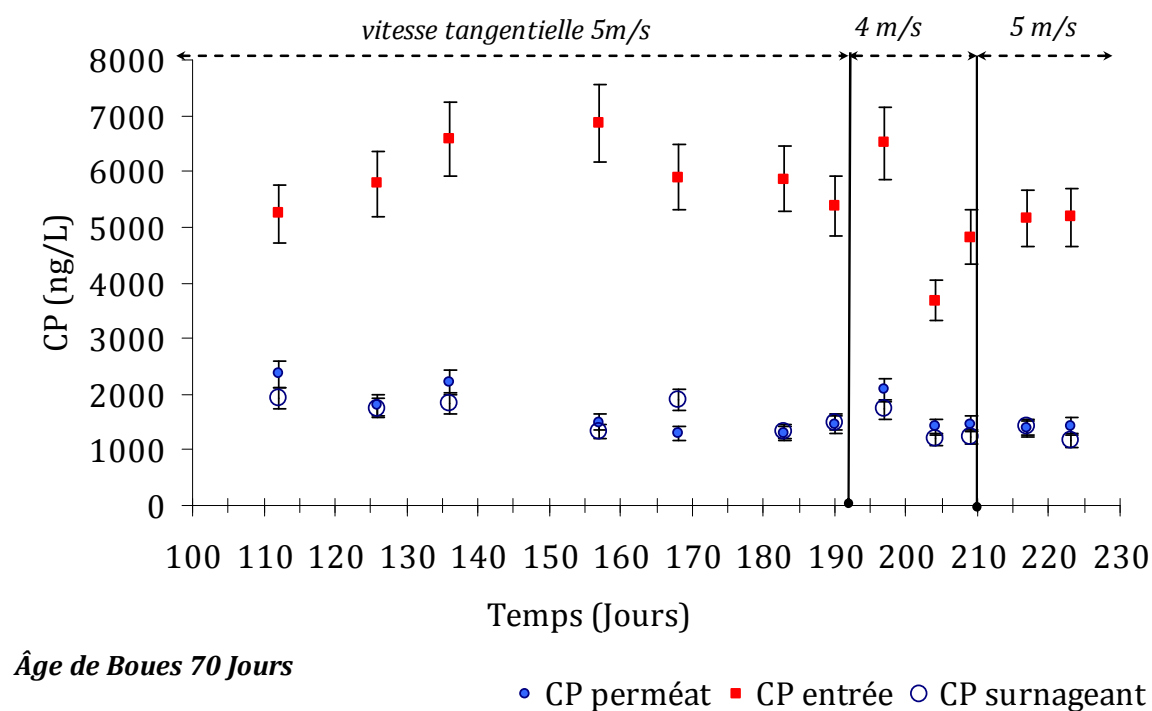


Figure 5.1.1(b) Evolution de la concentration en CP à l'entrée, dans le surnageant et dans le perméat du bioréacteur BAM R1 CP dans le temps durant la campagne expérimentale II.

Dans les deux campagnes expérimentales, les concentrations en CP dans le surnageant et dans le perméat du bioréacteur sont très similaires, ce qui indique qu'il n'y a aucune rétention par la membrane lors de la filtration, quel que soit son degré de colmatage. Pour certains jours, surtout lors de la campagne expérimentale I, des valeurs de la concentration en CP dans le perméat sont supérieures à celles du surnageant (figure 5.1.1 (a), 8 points). Les extractions étant réalisées par lots de 8 échantillons, nous supposons que cet écart est lié à une erreur de manipulation lors de l'extraction du CP des échantillons au dichlorométhane.

Au-delà de ces observations, le résultat marquant qui découle de ces figures est que la rétention du cyclophosphamide par l'ensemble membrane + dépôt développé sur la surface de la membrane est négligeable.

A partir de la concentration en CP à l'entrée (C_e , mesurée expérimentalement) du BAM R1 CP et la concentration dans le perméat (C_p), le pourcentage d'élimination est calculé, selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'élimination} : \left(1 - \frac{C_p}{C_e} \right) \cdot 100$$

Les figures 5.1.2 (a) et (b) montrent l'évolution du pourcentage d'élimination du CP en fonction du temps lors de la première et deuxième campagne expérimentale, respectivement.

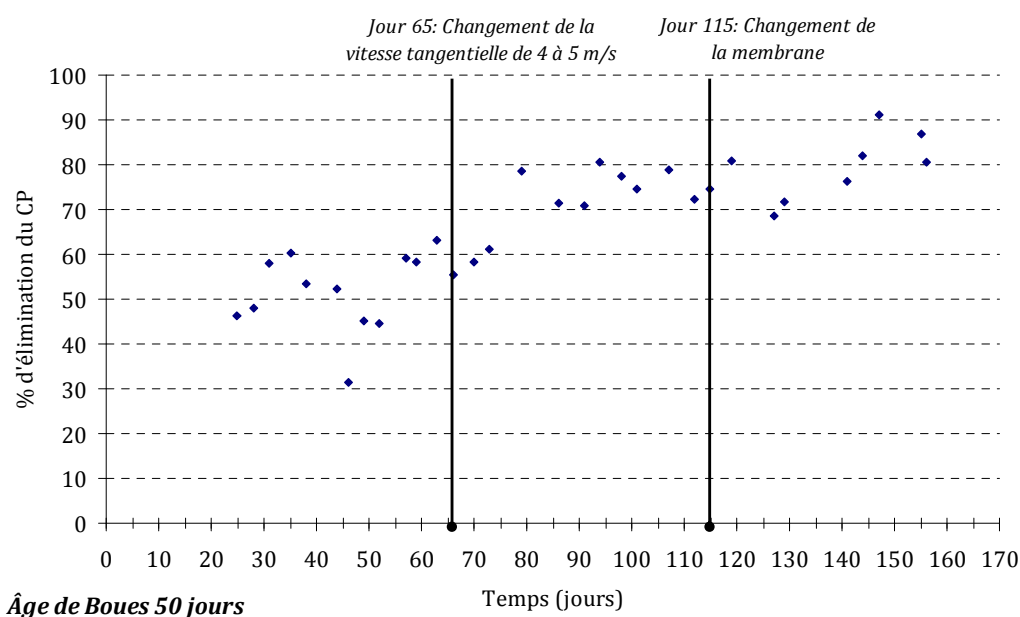


Figure 5.1.2 (a) Evolution du pourcentage d'élimination du CP en fonction du temps lors de la première campagne expérimentale.

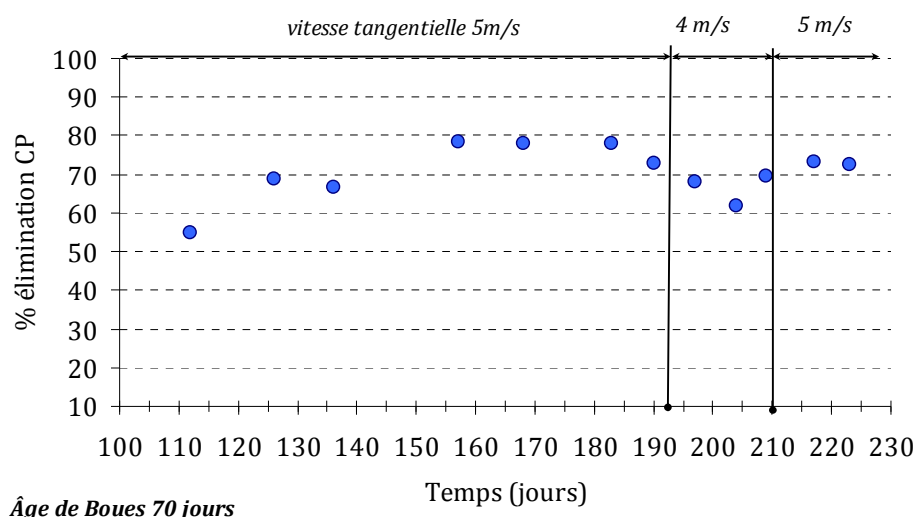


Figure 5.1.2 (b) Evolution du pourcentage d'élimination du CP en fonction du temps lors de la deuxième campagne expérimentale.

Pour les deux campagnes expérimentales, l'élimination du CP a lieu dès les premiers jours après l'ajout du cocktail de composés pharmaceutiques. Le pourcentage d'élimination augmente au cours du temps. Durant la campagne à un âge de boues de 50 jours (figure 5.1.2 (a)), le pourcentage d'élimination est d'environ 45% après un âge de boue, 75% après deux âges de boues, et d'environ 85% après trois âges de boues. Pendant la deuxième campagne expérimentale, le pourcentage d'élimination est d'environ 70% après deux et trois âges de boues (jour 140 et jour 210, figure 5.1.2 (b)). La valeur maximale atteinte est de 80 % d'élimination. La diminution sensible du pourcentage d'élimination entre les jours 190 et 210 lors de la deuxième campagne expérimentale, correspondent à une diminution en la concentration en CP à l'entrée. Dans le paragraphe 5.2, nous discuterons de l'influence de la concentration à l'entrée sur l'élimination de la molécule.

Afin de comparer les performances du BAM R1 CP lors de deux campagnes expérimentales, la figure 5.1.3 présente l'évolution du pourcentage d'élimination du CP en fonction du temps. L'axe du temps est recalculé, le jour 0 étant le premier jour d'ajout du cocktail, pour les deux campagnes. L'évolution de la concentration en MES dans le bioréacteur BAM R1 CP et de la concentration en CP à l'entrée du bioréacteur sont aussi présentées dans la figure 5.1.4.

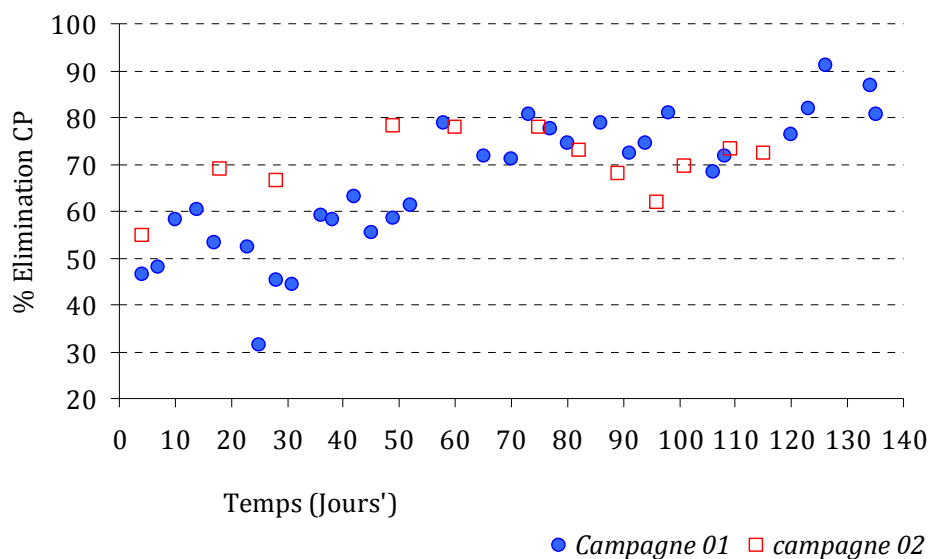


Figure 5.1.3 Evolution du pourcentage d'élimination du CP en fonction du temps lors des deux campagnes expérimentales.

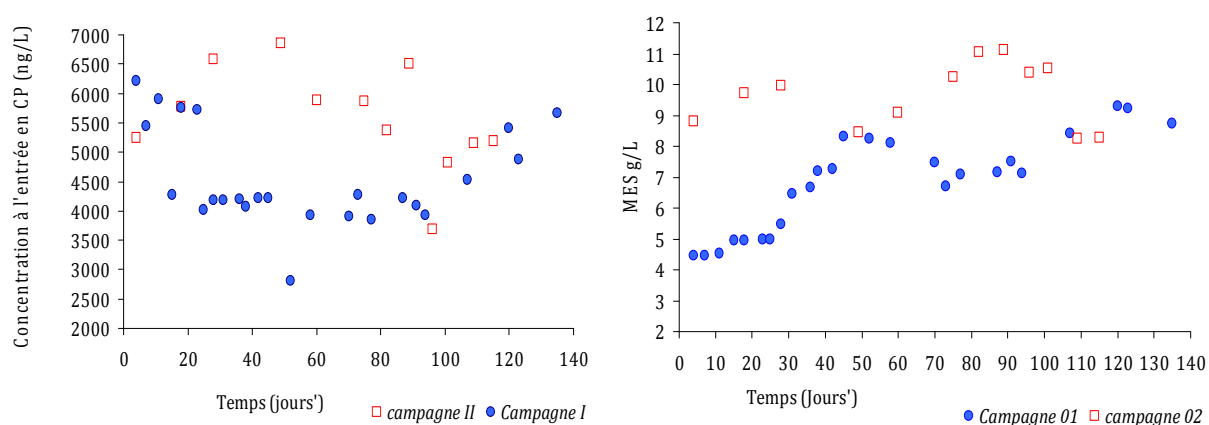


Figure 5.1.4 Evolution de la concentration en MES dans le réacteur et de la concentration en CP à l'entrée en fonction du temps lors des deux campagnes expérimentales.

Lors de la campagne à un âge de boues de 70 jours, la concentration à l'entrée en CP et la concentration en MES dans le BAM R1 CP sont plus importantes que lors de la campagne I. Cependant, les capacités d'élimination du CP sont très semblables durant les deux campagnes.

Après 70 jours d'ajout en continu du cocktail, les pourcentages d'élimination du CP sont d'environ 80% durant les deux campagnes expérimentales (figure 5.1.3). Cependant, à la fin de la première campagne expérimentale, des valeurs supérieures à 80% d'élimination sont atteintes, éventuellement dues à un temps d'adaptation de microorganismes au cocktail de composés

pharmaceutiques plus long par rapport à la deuxième campagne (2.7 fois l'âge de boue de traitement du cocktail pour la première campagne, 1.6 fois l'âge de boues de traitement du cocktail pour la deuxième campagne). Selon ces résultats, il semble qu'un âge de boues de 50 jours soit suffisant pour atteindre des pourcentages d'élimination du CP de 80%. L'augmentation de l'âge de boues à 70 jours n'apporte pas d'amélioration significative. La question sur l'élimination du CP à des âges de boues inférieurs à 50 jours, reste toujours ouverte.

L'effet de l'âge de boues sur l'élimination de certains micropolluants a déjà été étudié. Weiss et Reemtsma (2008) ont étudié l'influence de l'âge de boue sur l'élimination des micropolluants polaires. Le potentiel d'un bioréacteur à membrane (échelle laboratoire) pour éliminer des polluants polaires des eaux usées municipales a été étudié pour des produits chimiques industriels et ménagers, sur une période de 22 mois. Dans cette étude, une faible tendance à l'amélioration de l'élimination est observée en augmentant l'âge de boues de 26 jours à 37 jours, mais il reste statistiquement insignifiant. En outre, ils observent que l'augmentation de l'âge de boues à 102 jours semble défavorable pour un composé qui était censé être dégradé par métabolisme.

5.2 Influence de la concentration en MES et de la concentration en CP à l'entrée du procédé sur le pourcentage d'élimination du CP.

Les figures 5.1.5 a et b présentent, l'évolution de la concentration en MES dans le réacteur et du pourcentage d'élimination du CP en fonction du temps lors de la campagne expérimentale I et II, respectivement.

Autant une relation apparaît entre la concentration en MES et le pourcentage d'élimination lors de la première campagne expérimentale, autant durant la deuxième campagne, aucune relation nette n'est observée. D'autre part, après l'ajout du cocktail, la concentration en MES lors de la première campagne, débute à 4,5 g/L et finit à environ 9 g/L. Tandis que durant la deuxième campagne, les variations de la concentration en MES sont moins importantes (entre 8,5 et 11), sa valeur moyenne est d'environ 9,5 g/L.

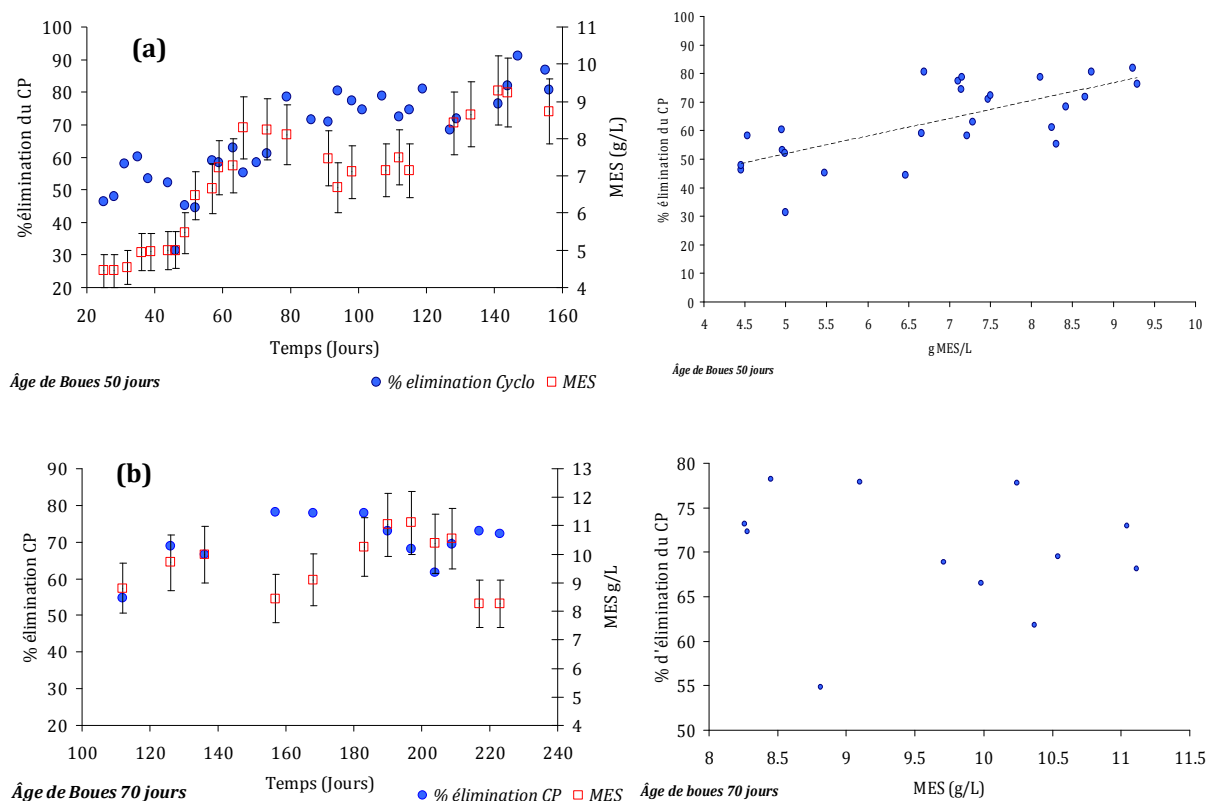


Figure 5.1.5 A gauche, évolution de la concentration en MES dans le réacteur et du pourcentage d'élimination du CP en fonction du temps. A droite, pourcentage d'élimination en fonction de la concentration en MES. Campagne expérimentale I (a), campagne expérimentale II (b).

Des études antérieures ont signalé l'influence de la concentration dans l'influent sur le pourcentage d'élimination de micropolluants (Lesjean et al., 2004 ; Bernhard et al., 2006 ; Joss et al. 2006 ; Mahnik et al., 2007. cf chapitre I, paragraphe 5.3.4).

Dans la figure 5.1.6 le pourcentage d'élimination du CP est tracé en fonction de la concentration en CP à l'entrée du BAM R1 CP, pour la campagne expérimentale II.

Nous résultats sont bien en accord avec ces études précédentes. En effet, durant la deuxième campagne expérimentale, le pourcentage d'élimination est légèrement supérieur lorsque la concentration en CP à l'entrée augmente (Figure 5.1.6).

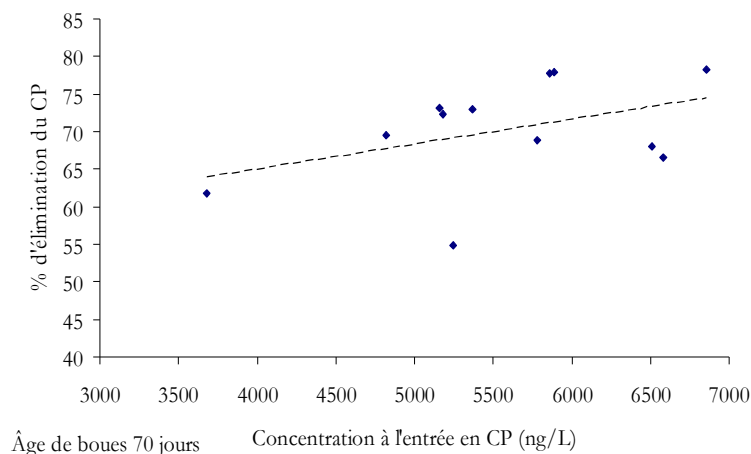


Figure 5.1.6 Pourcentage d'élimination du CP en fonction de la concentration en CP à l'entrée du BAM R1 CP. Campagne expérimentale II.

La figure 5.1.7 présente le pourcentage d'élimination du CP en fonction de la concentration à l'entrée durant la première campagne expérimentale.

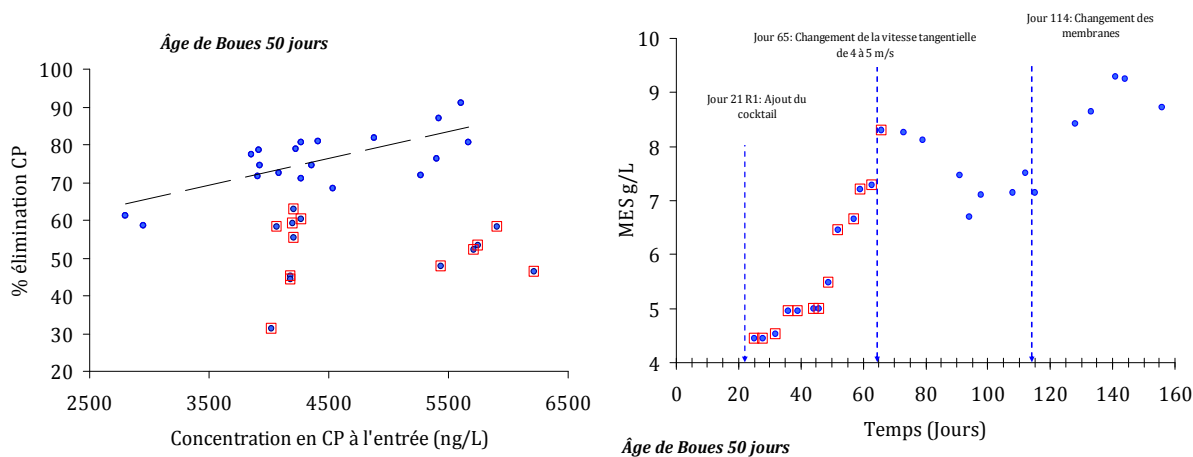


Figure 5.1.7 A gauche, pourcentage d'élimination du CP en fonction de la concentration à l'entrée durant la première campagne expérimentale. A droite, évolution de la concentration en MES en fonction du temps. Les points carrés représentent les premiers jours après l'ajout du cocktail, du jour 21 au jour 66.

Durant les premiers jours après l'ajout du cocktail (du jour 21 au jour 66, points carrés figure 5.1.7) le pourcentage d'élimination est indépendant de la concentration à l'entrée. Cependant,

après le jour 66, lorsque la concentration en MES est supérieur à 7 g/L, le pourcentage d'élimination du CP s'élève avec l'augmentation de la concentration en CP à l'entrée. Ce phénomène est observé aussi lors de la deuxième campagne, où la concentration en MES est supérieure à 8,5 mg/L et le pourcentage d'élimination augmente avec la concentration en CP à l'entrée du procédé.

Nous pouvons avancer que l'élimination du cyclophosphamide, est influencée par la concentration en MES lorsqu'on n'est pas en régime stable, puis par la concentration dans l'influent quand la concentration en MES est importante (supérieur à 7 g/L).

La biodégradabilité du cyclophosphamide a été précédemment examinée par d'autres groupes de recherche avec divers essais, conformément aux Test OCDE donnant des résultats négatifs pour chacun des tests (Ready et inherent tests) (Steger-Hartmann et al., 1997 ; Kiffmeyer et al., 1998 ; Kümmerer et al., 1997). Même à des concentrations plus faibles (90 ng/L et 900 ng/L), aucune dégradation du cyclophosphamide n'a pu être observée dans les 24 h (Buerge et al., 2006). Même si d'autres études indiquent que le CP n'est pas ou peu biodégradable, on observe dans notre étude une disparition de cette molécule de la phase liquide.

Rappelons que les mécanismes possibles d'élimination de micropolluants incluent, l'adsorption sur les floes des boues, la biodégradation, la volatilisation, et le stripping (Dionisi et al., 2007).

Nous avons observé au préalable que la rétention du CP par la membrane est négligeable. Di Guardo et al. (2001) jugent négligeables d'autres processus d'élimination du cyclophosphamide tels que la volatilisation et le stripping, ou la sorption sur la boue en raison de la faiblesse de la constante d'Henry ($6.9 \times 10^{-11} \text{ atm L/mol}$) et du faible coefficient de partage octanol-eau ($\log K_{ow} \approx 0,63$), respectivement. (Di Guardo et al., 2001). Néanmoins, en ce qui concerne les produits pharmaceutiques (Chapitre I, paragraphe 2.1.5), des études récentes ont révélé que les valeurs de K_{ow} et K_{oc} ne sont pas adéquates pour simuler leurs propriétés de sorption sur les boues car les produits pharmaceutiques contiennent souvent des groupes fonctionnels polaires (par exemple des fractions carboxyliques, des aldéhydes et des amines), pouvant interagir avec seulement des parties de la matière organique ou avec des minéraux (Goss et Schwarzenbach, 2001; Golet et al., 2003; Ternes et al., 2004). La sorption dans les stations d'épuration peut être raisonnablement estimée à l'aide du coefficient K_D (Schwarzenbach, 2003).

D'après la littérature, les deux mécanismes possibles pouvant expliquer l'élimination du CP observée sont : l'adsorption et la biodégradation. Dans le paragraphe suivant, nous étudions le phénomène d'adsorption du CP sur de la biomasse inactivée.

5.3 Test d'adsorption et stabilité de la molécule.

Dans le chapitre II, nous avons décrit le protocole d'analyse utilisé pour déterminer la capacité d'adsorption du CP sur la boue, ainsi que la stabilité de la molécule. La méthode consiste à mesurer la concentration en Cyclophosphamide résiduelle après ajout de boues séchées exemptes de médicament dans une solution à concentration connue de CP et un temps de contact de 2 jours.

L'adsorbant utilisé correspond à de la boue du bioréacteur à membrane BÀM R2 Contrôle de la campagne expérimentale II (il ne contient pas le cyclophosphamide et ses métabolites), qui a été préalablement séchée à 80°C pendant 2 jours pour assurer l'élimination de l'activité biologique et le séchage complet de la boue.

Les différentes concentrations d'équilibre de CP ont été atteintes par différentes concentrations de dopage de CP (1, 10, 20 et 50 mg / L) dans la même masse de boues (7,5 g / L). Le pH mesuré au début et à la fin de l'expérience est de 5.8 (pH de l'eau distillée), la température est maintenue constante à 25°C.

La quantité adsorbée (q_e) exprimée en milligramme de soluté par gramme de solide, est calculée à partir de l'équation suivante :

$$q_e = \frac{(C_o - C_e).V}{m_{adsorbant}}$$

Avec, C_o : concentration en soluté dans la phase liquide au début (mg/L)

C_e : concentration en soluté dans la phase liquide lorsque l'on est à l'équilibre (mg/L)

$m_{adsorbant}$: masse d'adsorbant (g)

V : volume de liquide dans le flacon (L) = 0.05L

Le tableau 5.3.1 regroupe les résultats obtenus après un temps de contact de 48 heures. Les échantillons de contrôle (blanc dans le tableau 5.3.1) sans boues ont été traités simultanément dans les mêmes conditions. D'après les résultats obtenus, **le cyclophosphamide reste stable**

pendant les deux jours d'expérimentation. D'après la littérature et ces résultats, nous pouvons dire ainsi, que l'hydrolyse du cyclophosphamide dans le bioréacteur lors du traitement est négligeable.

Tableau 5.3.1. Adsorption du CP sur la boue activée du BAM R2 Contrôle.

C_0 (i, T): (mg/L)	C_0 (blanc): (mg/L)	C_e : (mg/L)	Masse adsorbant (g)	Q_e : (mg CP/g)	K_D (L/Kg)	Log K_D
1	1.257±0.013	0.1836	0.3754	0.143	778.57	2.89
10	12.272±0.294	1.173±0.1	0.3755	1.478	1259.53	3.10
20	23.860±0.209	4.329	0.3756	2.600	600.48	2.78
50	52.942±0.484	10.497	0.3754	5.653	538.52	2.73

Avec, C_0 (i, T): Concentration en CP initiale théorique (mg/L)

C_0 (blanc): Concentration en CP finale mesurée dans les blancs (mg/L)

C_e : Concentration finale à l'équilibre en CP (mg/L)

Q_e : quantité adsorbée (mg CP/g)

K_D : coefficient d'absorption spécifique K_D (L/kg MES). Ce coefficient de partage est estimé selon l'équation : $K_D = Q_e \cdot 1000 / C_e$

La figure 5.3.1 présente l'isotherme d'adsorption du cyclophosphamide sur la boue du BRM R2 contrôle.

Nous utilisons le modèle de Freundlich pour relier les données expérimentales d'adsorption. Ce modèle Freundlich a été largement adopté pour caractériser l'adsorption des polluants organiques dans l'eau (Jianlong et al., 2000 ; Clara et al., 2004). L'équation de Freundlich est utilisée pour les énergies de surface hétérogène, comme c'est le cas des floes de boue activée :

$$qe = k_f \cdot C_e^{1/n}$$

Les valeurs obtenues pour le système étudié est $K_f = 0.8023$ (L/g), $1/n = 0.8828$. Dans notre cas $1/n < 1$, donc l'adsorption est favorable. Les coefficients K_f et $1/n$ donnent des mesures approximatives de la capacité d'adsorber et de l'intensité de l'adsorption, respectivement.

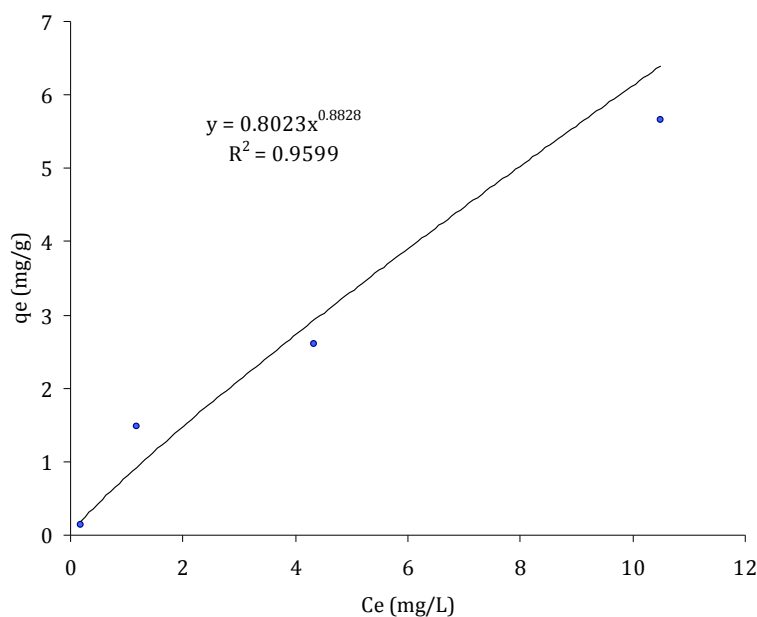


Figure 5.3.1 Isotherme d'adsorption du cyclophosphamide sur la boue du BRM R2 contrôle.

5.4 Discussion

La valeur moyenne de K_D obtenue est de 794.28 L/kg, avec $\log K_D$ moyen = 2.87. Ternes et al, (2004) rapportent une valeur K_D égale à 2.4 ± 0.5 L/kg pour le cyclophosphamide adsorbé sur des boues d'une station dépuration municipale, mesurée en expériences Batch (concentration en boues, 4g/L, 15°C, pH 7.5, concentrations en CP entre 10 et 20 µg/L). Nous supposons que la différence entre la valeur obtenue dans notre étude et celle rapportée par Ternes et al, (2004) est due aux différences des conditions expérimentales, ainsi qu'au type de boue utilisé (Bioréacteur à membrane et boues activée classiques). Cependant, nous ne pouvons écarter la possibilité que la valeur obtenue dans notre étude puisse être surestimée.

Théoriquement, la sorption des substances sur la boue avec des valeurs de $\log K_D$ inférieures à 2, est négligeable, alors que, la sorption des substances sur la boue avec des valeurs de $\log K_D$ supérieures à 4, est l'un des principaux processus d'élimination (Clara et al., 2004). Joss et al., (2005) affirment que pour des composés dont le coefficient d'adsorption (K_d) est inférieur à 300 L/Kg, l'adsorption sur la biomasse n'est pas significative et la transformation peut être évaluée simplement en comparant les concentrations en entrée et en sortie du procédé. Les chercheurs participant au projet POSEIDON affirment que la sorption peut être négligée pour des composés avec un $K_D \leq 500$ L/kg.

Selon la littérature et nos résultats ($K_D = 538.52 - 1259.53 \text{ L/kg}$, $\log K_D = 2.73-3.10$), l'adsorption du CP sur la boue activée dans le bioréacteur à membrane peut être un processus non négligeable, sans être le mécanisme principal d'élimination. L'adsorption pourrait également influencer en particulier le rendement d'autres processus tels que la biodégradation (Bekbolet et al., 1999).

D'autre part, certains auteurs indiquent que la transformation par cométabolisme¹ pourrait être le principal mécanisme de suppression de ces composés dans le traitement des boues activées ou les eaux usées municipales (Clara M. et al., 2005 ; Quintana et al., 2005 ; De Weber et al., 2007).

La figure 5.4.1 présente l'évolution de la concentration en 4-Keto-cyclophosphamide (un métabolite du CP) en fonction du temps durant les deux campagnes expérimentales.

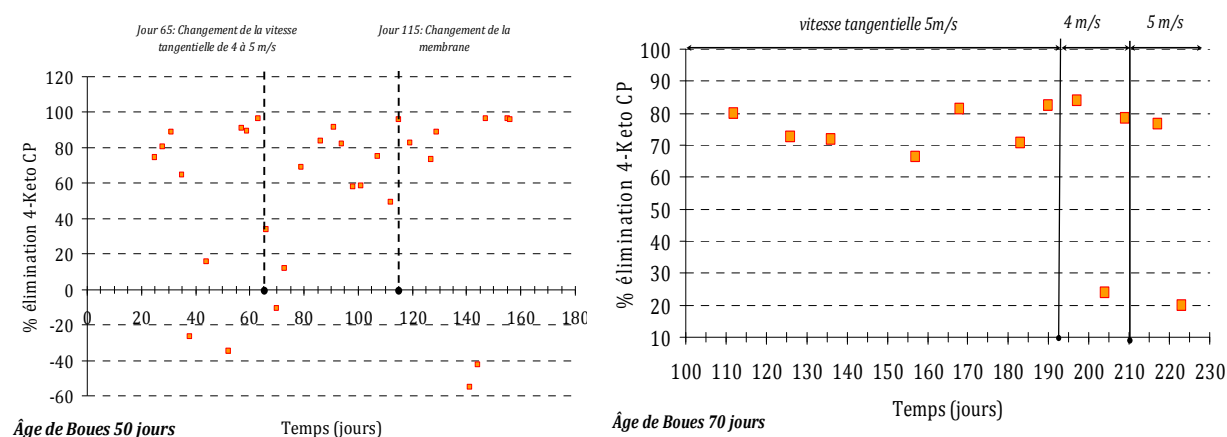


Figure 5.4.1 Evolution de la concentration en 4-Keto-CP en fonction du temps durant les deux campagnes expérimentales.

Le pourcentage d'élimination du 4-Keto-CP est supérieur à celui du cyclophosphamide. Cependant, durant certains jours, le pourcentage d'élimination chute. D'ailleurs durant la première campagne expérimentale, certains pourcentages d'élimination sont négatifs, ce qui implique que la valeur de la concentration dans le perméat en 4-Keto-CP est supérieure à celle à l'entrée du bioréacteur. Nous pouvons penser à :

¹ Le cométabolisme est défini comme la transformation d'un substrat ne servant pas à la division cellulaire en présence obligatoire d'un substrat de croissance ou d'un autre composé assimilable (Dalton, H. et Stirling, D.I. 1982. Co-metabolism. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B*., **297** : 481-496).

- des phénomènes d'adsorption/désorption,
- des problèmes d'analyse,
- transformation du CP en 4-Keto-CP. Le CP serait transformé en un intermédiaire inconnu, la transformation de ce métabolite inconnu serait, durant certaines périodes, en faveur du 4-Keto-CP.

D'après le schéma du métabolisme humain du cyclophosphamide (Cf chapitre II, paragraphe 2.1.3, figure 2.13.2) une mole de CP produit une mole de 4-Keto CP, passant par le métabolite intermédiaire 4-hydroxycyclophosphamide. D'ailleurs, les périodes où les concentrations dans le perméat en 4-Keto-CP augmentent, correspondent à des périodes où la toxicité dans le surnageant et dans le perméat sont importantes (Cf paragraphe 5.5.1). Ce métabolite (4-KetoCP) étant moins toxique que d'autres métabolites (acroléine, moutarde phosphoramidate et moutarde nor-azoté) pourrait être produit davantage, en même temps que la toxicité du milieu devient importante. Des trois hypothèses proposées au préalable pouvant expliquer l'augmentation de la concentration en 4-keto-CP à la sortie du procédé, nous proposons la transformation du CP en 4-Keto CP.

Finalement, nous pouvons conclure que des processus d'adsorption et de biodégradation contribuent à la fois à l'élimination du CP de l'eau résiduaire traitée.

En première approche pour déterminer la contribution de chaque processus sur l'élimination du CP, nous avons réalisé un bilan de matière sur le CP. Le bilan s'écrit comme suit :

Quantité totale sortante dans le perméat du procédé durant toute la durée de la campagne expérimentale

=

Quantité totale entrante au procédé

- quantité totale sortante dans la phase soluble de la purge
- quantité totale sortante dans la phase solide de la purge
- quantité totale adsorbée sur la biomasse à l'équilibre
- quantité totale biodégradée
- quantité totale retenue par la membrane.

$$\begin{aligned} \overline{C}_{P,p} \cdot \overline{Q}_p \cdot \Delta t = \overline{C}_{P,e} \cdot \overline{Q}_e \cdot \Delta t - \overline{C}_{P,s} \cdot \overline{Q}_p \cdot \Delta t - \frac{\left(\sum_{i=1}^n \left[0.8023 \cdot (C_{P,i,s})^{0.8828} \right] \cdot MES_i \cdot \overline{Q}_p \right)}{n} \cdot \Delta t \\ - \left[0.8023 \cdot (C_{P,s,t})^{0.8828} \right] \cdot MES_t \cdot V_R - K_{bio} \cdot \left(\frac{\sum_{i=1}^n MES_i \cdot C_{P,i,s}}{n} \right) \cdot V_R \cdot \Delta t \end{aligned}$$

Avec,

C_p : Concentration en Cyclophosphamide (mg/L). $C_{p,p}$ dans le perméat, $C_{p,e}$ à l'entrée, $C_{p,s}$ dans le surnageant, $C_{p,i,s}$ dans le surnageant le jour i, $C_{p,s,t}$ dans le surnageant le dernier jour d'expérimentation. \overline{C} = concentration moyenne.

Q_p : Débit de perméat = Débit d'alimentation Q_e . (L/J). \overline{Q} = débit moyen.

MES: Concentration en matière en suspension (g/L). MES_i le jour i, MES_t le dernier jour d'expérimentation.

K_{bio} : Constante de cinétique de dégradation (L/g/j) (D'après Joss et al., 2006).

V_R : Volume réactionnel (L).

Δt : Durée totale de la campagne expérimentale (Jours).

Nous tenons à rappeler que ceci n'est qu'une estimation. L'équation de Freundlich calculée au préalable a été extrapolée aux deux campagnes expérimentales. Le bilan est réalisé à partir de valeurs moyennes et pour la totalité de la durée de la campagne expérimentale. En outre, il est possible que la quantité de CP adsorbée sur la biomasse soit aussi postérieurement biodégradée. Pour boucler complètement le bilan, il faudrait déterminer la quantité réelle restant dans la biomasse après extraction du Cyclophosphamide de la phase solide et dosage par HPLC/MS/MS.

Au préalable nous avons démontré que la rétention du CP par la membrane est négligeable. Le tableau 5.4.1 résume le bilan réalisé.

Tableau 5.4.1 Estimation de la contribution du processus d'adsorption et de biodégradation sur l'élimination du CP.

	Campagne I	Campagne II
Durée totale en présence du CP (J)	135	115
Concentration moyenne en CP à l'entrée (mg/L)	0.004565497	0.00557704
Concentration moyenne en CP dans le surnageant (mg/L)	0.001200	0.001524
Concentration en CP dans le surnageant au dernier jour (mg/L)	0.000736	0.00116
Concentration moyenne en CP dans le perméat (mg/L)	0.00155	0.00164
Débit moyen d'alimentation (L/J)	9.05	14.15
Débit moyen de purge (L/J)	20/50 = 0.4	20/70 = 0.286
MES dans le BAM R1 CP au dernier jour (g/L)	8.73	8.28
masse totale entrante (mg)	5.576	9.075
masse totale sortante perméat (mg)	1.89	2.67
masse totale éliminée par phase liquide de la purge (mg)	0.0648	0.0501
masse totale éliminée par la phase solide de la purge (mg)	0.837	0.828
masse totale éliminée par adsorption sur la boue dans le bioréacteur (mg)	0.2401	0.3403
masse totale éliminée par biodégradation (mg)	2.543	6.0125
% proportion masse adsorbée (Purge + biomasse dans le bioréacteur) / masse totale entrante	<u>19.316</u>	<u>12.879</u>
% Proportion masse éliminée par biodégradation/ masse totale entrante	<u>45.609</u>	<u>66.254</u>
% Proportion masse éliminée dans la phase liquide de la purge/ masse totale entrante	1.1624	0.5517
Constante de cinétique de dégradation K_{bio} (L/g/j). (D'après Joss et al., 2006).	0.107	0.177

La constante cinétique de biodégradation, K_{bio} calculée à partir du bilan de CP est légèrement supérieure à 0.1 L/g/j pour les deux campagnes expérimentales. D'après la classification réalisée

par Joss et al., (2006) (cf chapitre I, 5.3.1), le cyclophosphamide est alors un composé avec une transformation modérée (Un pourcentage d'élimination de 20% est prévu pour des stations d'épuration capables d'éliminer l'azote et le phosphore des eaux usées municipales, âge de boues > 8 jours).

Cette estimation, permet de conclure que le processus le plus important d'élimination du CP pourrait être la biodégradation.

5.5 Test de génotoxicité et de cytotoxicité

La totalité des tests de génotoxicité et de cytotoxicité ont été réalisés au laboratoire de Génie Chimique, à l'ENSAT, par Virginie Faucet-Marquis dans le cadre du projet TOXEAUBAM dont cette étude fait partie. Nous citons les résultats les plus importants concernant l'élimination de la toxicité liée au cyclophosphamide et à ses principaux métabolites. Les figures montrant les résultats sont présentées dans l'annexe 7. Il est intéressant de rapprocher le paramètre « toxicité » des résultats « épuratoires » du procédé bioréacteur à membrane. Malheureusement, nous ne sommes pas en mesure de fournir tous les résultats car, il reste encore des échantillons à analyser, surtout parmi ceux de la deuxième campagne expérimentale.

5.5.1 Tests de cytotoxicité

L'évaluation de la cytotoxicité est réalisée par la mesure de la prolifération de cellules traitées par rapport au contrôle (cellules non traitées). La prolifération est mesurée quantitativement par le test colorimétrique au tétrazolium (dite méthode au MTT) et basée sur l'activité métabolique des cellules viables. Des tests de prolifération cellulaire ont été réalisés sur différentes lignées cellulaires telles que les cellules hépatiques humaines (HepG2) ou des cellules rénales humaines et animales. La lignée hépatique humaine HepG2 est la plus sensible aux effets des produits testés.

a. Test de cytotoxicité du Cyclophosphamide, de l'acroléine, de la moutarde phosphoramidate et de la moutarde norazotée sur des cellules HePG2.

Après 24h de contact avec le CP (0,5µM) on note 20% de diminution de la viabilité et 40% après 48h de traitement. En ce qui concerne les métabolites réactifs du CP tels que l'acroléine (Acr), la

moutarde phosphoramidate (MP) et la moutarde norazotée (MN), ils induisent une prolifération cellulaire importante dès les concentrations les plus faibles testées (0,05 µM).

Ainsi nous pouvons observer une modulation de la viabilité des cellules (mortalité accrue ou au contraire prolifération) par ces produits. De ce fait, le suivi des échantillons sortant du bioréacteur est néanmoins complexe parce que (a) les effets contraires engendrés par les substances mères et ses métabolites entraînent une 'annulation' des effets (b) la dilution nécessaire de l'échantillon dans le milieu de culture cellulaire rend ce test peu sensible.

b. Test de cytotoxicité du surnageant et du perméat des deux bioréacteurs sur des cellules HePG2. Campagne expérimentale I.

La viabilité cellulaire a été étudiée sur les perméats et les surnageants des deux bioréacteurs. Les résultats de la campagne I, montrent des effets de prolifération dans le surnageant du BAM R1 CP les jours 58, 60, 64, 108, 113, 131, et des effets cytotoxiques les jours, 141 et 145 de fonctionnement du pilote (Figure A7.1.1 annexe 7.).

Dans le perméat du BAM R1 CP, nous n'observons pas d'effet de prolifération. Les jours 53, 58, 69, 72 et 142, nous observons un très léger effet cytotoxique dans le perméat du BAM R1 CP (figure A7.1.2 annexe 7). En général, les valeurs de viabilité dans le perméat sont comparables au témoin.

c. Test de cytotoxicité de l'eau d'entrée, du surnageant et du perméat des deux bioréacteurs sur des cellules HePG2. Campagne expérimentale II.

L'analyse de la viabilité cellulaire des eaux d'entrée des bioréacteurs montre l'induction d'une forte prolifération cellulaire, celle-ci, étant comme on pouvait s'y attendre, plus importante lors de la présence du cocktail CP plus métabolites (Figures A7.3.1 et A7.3.2, annexe 7). Au niveau des perméats des deux bioréacteurs, on observe un retour à la normale avec des valeurs de viabilité comparables au témoin (figures A7.3.4 et A7.3.5 annexe 7). Dans le surnageant du BAM R1 CP, un très léger effet de prolifération est observé le jour 200 et un très léger effet cytotoxique est observé les jours 207 et 214 (figure A7.3.3, annexe 7)

5.5.2 Test de génotoxicité

Le test des « comètes » ou SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) est un test de génotoxicité, mesurant des lésions primaires de l'ADN. Il est très utilisé en écotoxicologie génétique, appliqué à

différentes espèces, il est très sensible pour le suivi et la recherche de toxicité de composés chimiques et de mélanges complexes.

Les échantillons du bioréacteur BAM R1 CP, dopé en cocktail de la 1^{ère} campagne ont été analysés par le test des comètes. Nous observons des différences, en particulier, une augmentation de la génotoxicité pour plusieurs échantillons. Ces échantillons génotoxiques correspondent aux jours de fonctionnement 114-116, 134-136, 145, 152 et 156-157 du bioréacteur, ceci étant observé aussi bien sur les surnageants que sur les perméats (figure A7.2.1 et A7.2.2 annexe 7).

Relation toxicité – fonctionnement du BAM R1 CP

Dans le but d'établir un lien entre la cytotoxicité et la génotoxicité observé dans le surnageant du BAM R1 CP et le fonctionnement du bioréacteur, nous allons recalculer la toxicité mesurée comme la valeur absolue des écarts entre les valeurs de viabilité (mortalité ou prolifération) pour les tests de cytotoxicité par rapport au 100% de viabilité du témoin. Le même raisonnement est utilisé pour les valeurs de génotoxicité.

Les valeurs absolues des écarts entre les valeurs de viabilité (mortalité ou prolifération) dans le surnageant du BAM R1 CP par rapport au 100% de viabilité du témoin sont montrées sur la figure 5.4.2 (a) en fonction du temps, ainsi que l'évolution de la pression transmembranaire lors de la campagne expérimentale I. De la même façon, la figure 5.4.2 (b) présente l'évolution des écarts entre les valeurs de génotoxicité dans le surnageant du BAM R1 CP par rapport à la valeur témoin et celle de la pression transmembranaire en fonction du temps.

Il est intéressant de noter que, lors de la première campagne expérimentale, l'augmentation de la cyto/génotoxicité dans le surnageant est survenue aux alentours des jours où la pression transmembranaire augmente considérablement et pour certains jours, lorsque la pression transmembranaire diminue largement, la toxicité dans le perméat augmente à son tour de manière considérable.

De la même manière que dans la figure 5.4.2, la cytotoxicité et la génotoxicité dans le surnageant et dans le perméat BAM R1 CP sont présentées, ainsi que l'évolution de la concentration en substances humiques et en polysaccharides en fonction du temps dans la figure 5.4.3.

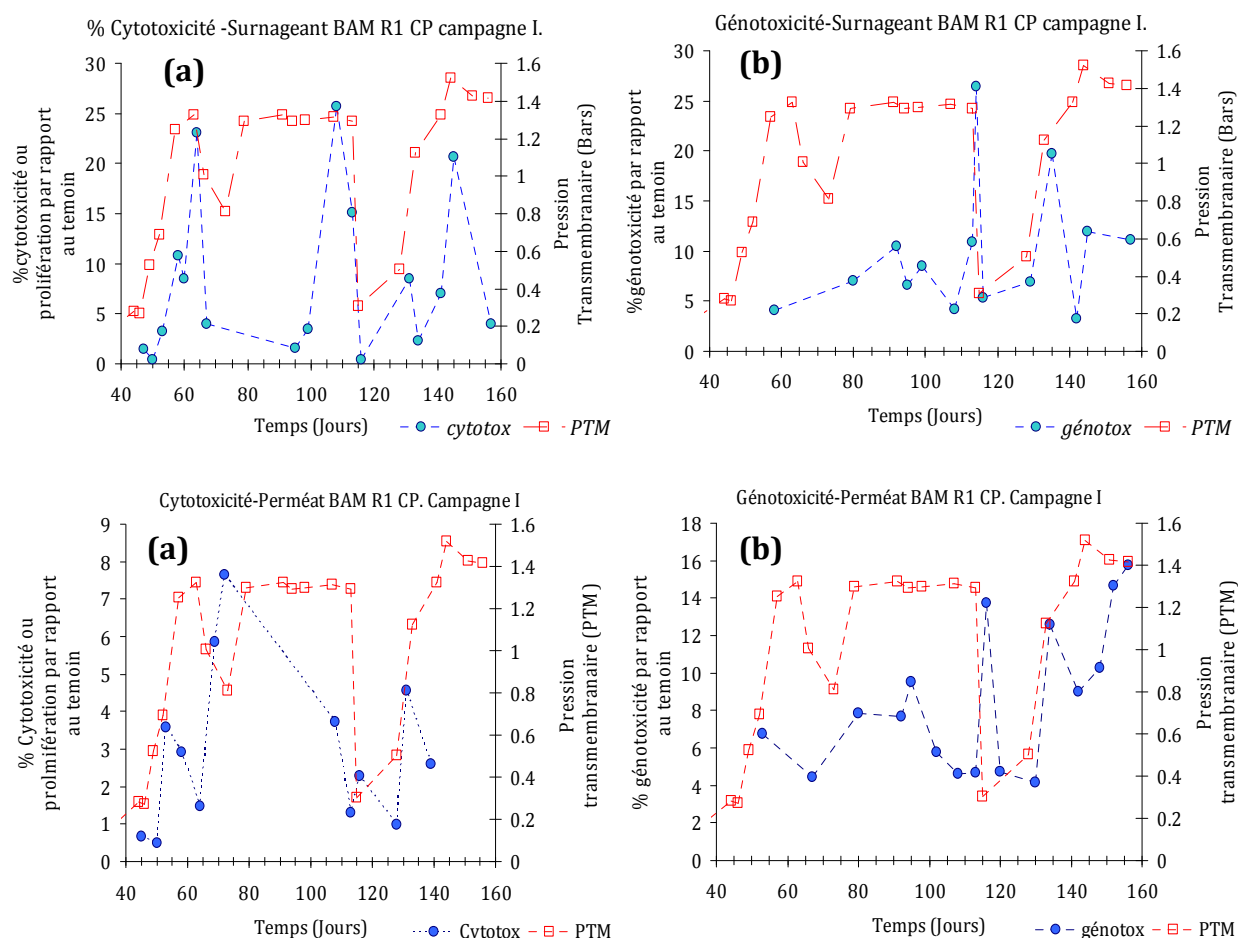


Figure 5.4.2 Evolution de la toxicité dans le surnageant et dans le perméat du BAM R1 CP et de la pression transmembranaire en fonction du temps. (a) Cytotoxicité ou prolifération (b) génotoxicité.

D'après la figure 5.4.3, l'augmentation de la toxicité dans le surnageant et dans le perméat du BAM R1 CP sur la viabilité des cellules hépatiques humaines (HepG2) (Test de cytotoxicité) correspond aussi aux jours où la concentration en acides humiques augmente. Par rapport à la génotoxicité dans le surnageant, nous n'observons pas une relation nette entre les substances polymériques extracellulaires et ce type de toxicité. Toutefois, la génotoxicité dans le perméat du BAM R1 semble avoir un lien avec la concentration en polysaccharides et en substances humiques.

Il reste à démontrer plus avant si ce phénomène (cyto/génotoxicité) provient d'une formation de dérivés du cyclophosphamide plus toxique par l'analyse chimique des métabolites et/ou de leur rétention probablement complexés sur les colloïdaux. La comparaison entre les résultats de toxicité sur le surnageant et sur le perméat de BAM R1 CP et ceux du BAM R2 Contrôle, nous

permettra d'écarter l'influence de composés provenant de l'alimentation ainsi que l'influence des substances exopolymériques elles-mêmes sur la toxicité totale observée dans les échantillons.

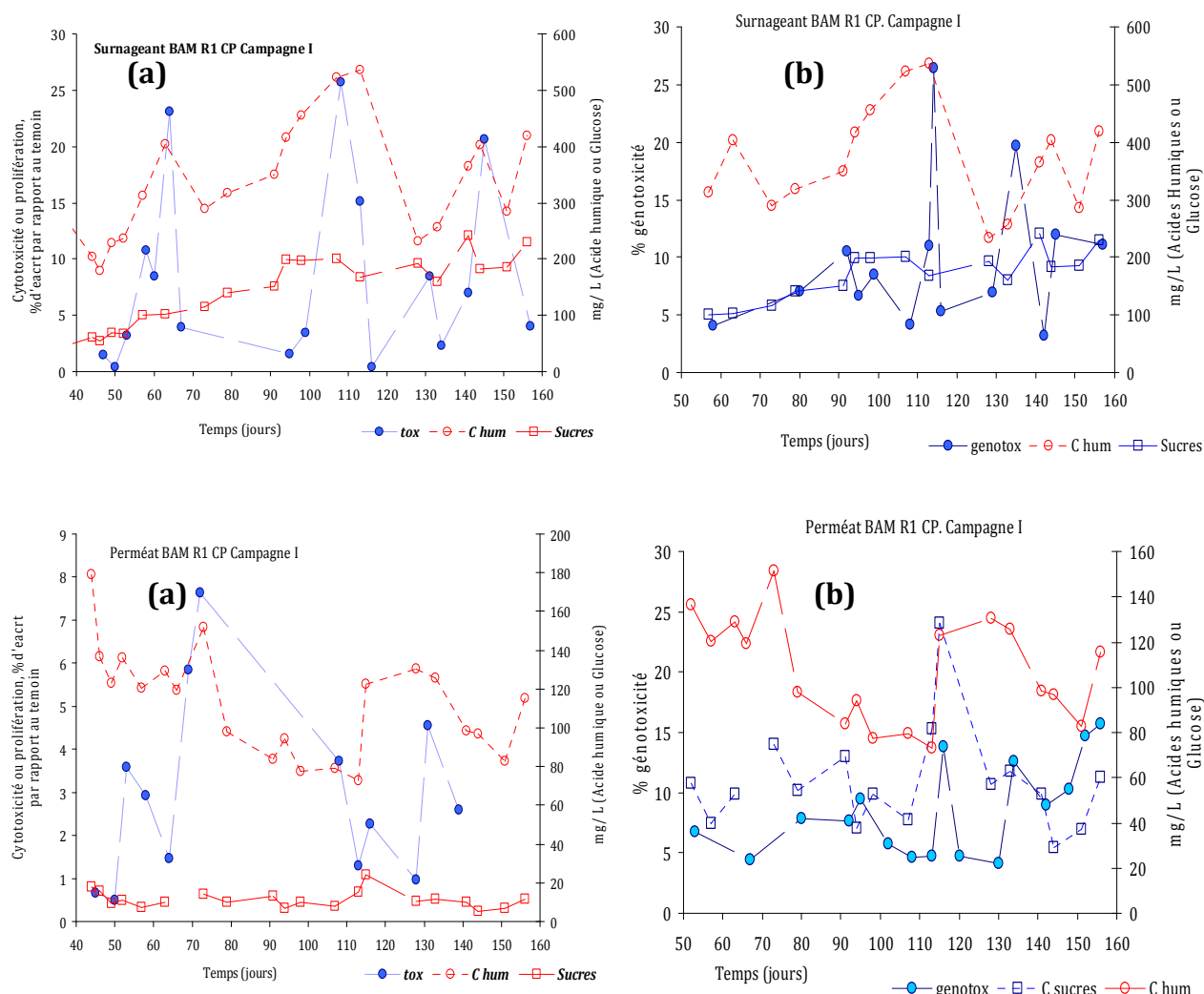


Figure 5.4.3 Evolution de la toxicité dans le surnageant et dans le perméat du BAM R1 CP et de la concentration en substances humiques et en polysaccharides au cours du temps. (a) Cytotoxicité ou prolifération (b) génotoxité.

Lors de cette étude nous avons utilisé un bioréacteur à membrane externe (BAME), fourni par notre partenaire du projet, PALL EXEKIA. Toutefois, il reste à étudier la capacité d'élimination du cyclophosphamide sur un bioréacteur à membranes immergées (BAMI) dont les contraintes de cisaillement sont beaucoup moins importantes.

D'après l'étude faite par Stricot (2008) il semblerait que les bioréacteurs à membrane externe présenteraient des meilleures capacités d'élimination vis-à-vis les composés toxiques par rapport aux bioréacteurs à membrane immergées (Bioréacteur à membrane à filtration semi-frontale avec

module externe). Stricot affirme que malgré une dispersion ou une fragmentation des agrégats générée dans le BAM externe, la biomasse issue de ce réacteur semble plus résistante que celle du BAM à filtration semi-frontale avec module externe à l'inhibition provoquée par une molécule toxique, le 2,4-Dichlorophénol.

5.6 Conclusions

Dans ce chapitre nous avons présenté les résultats des deux campagnes expérimentales concernant l'élimination du cyclophosphamide, ainsi que la réduction de la toxicité liée à ses principaux métabolites. Nous avons étudié deux âges de boues élevés: un âge de boues de 50 jours pour la première campagne, de 160 jours et un âge de boues de 70 jours pour la seconde qui a duré 225 jours.

L'élimination du Cyclophosphamide (CP) et du métabolite 4-Keto-CP durant la première campagne expérimentale est d'environ 80% pour les deux composés, avec des variations importantes pour le pourcentage d'élimination du métabolite 4-Keto CP. Certains jours, le pourcentage d'élimination chute, prend éventuellement des valeurs négatives durant la première campagne expérimentale, ce qui implique que la valeur de la concentration dans le perméat en 4-Keto-CP est supérieure à celle à l'entrée du bioréacteur. Le CP serait transformé en un intermédiaire inconnu, et durant certaines périodes, ce métabolite inconnu serait transformé d'avantage en 4-Keto-CP. Les périodes où les concentrations dans le perméat en 4-Keto-CP augmente, correspondent à des périodes où la toxicité dans le surnageant et dans le perméat sont importantes. Ce métabolite (4-KetoCP) bien qu'étant moins toxique que d'autres métabolites (acroléine, moutarde phosphoramide et moutarde nor-azoté) pourrait être produit d'avantage, en même temps que la toxicité du milieu devient trop importante.

Lors de la deuxième campagne expérimentale, les pourcentages d'élimination du CP et du 4-Keto CP, sont à peu près similaires à celles obtenues lors de la première campagne. Selon ces résultats, il semble qu'un âge de boues de 50 jours soit suffisant pour atteindre des pourcentages d'élimination du CP favorables. L'augmentation de l'âge de boues à 70 jours n'apporte pas d'amélioration significative. La question sur l'élimination du CP à des âges de boues inférieurs à 50 jours, reste toujours ouverte. Cependant, étant donné que le phénomène d'adsorption du CP, et potentiellement aussi celui de ses métabolites, est présent à la fois avec le processus de biodégradation, l'augmentation de l'âge de boues serait donc favorable car on diminuerait le rejet

de ces molécules contenues dans les purges (tant dans la phase liquide comme dans la phase solide). Il serait intéressant d'évaluer la génotoxicité de la boue activée traitant le cocktail pharmaceutique. Si la boue présente des propriétés toxiques, un traitement spécial devrait être employé pour ce type de rejet. D'ailleurs, Jolibois et al, 2008 affirment que lorsque les boues sont incinérées à température convenable, aucun risque génotoxique n'est envisagé.

Un autre résultat important est que la rétention du cyclophosphamide par l'ensemble membrane + dépôt développé sur la surface de la membrane est négligeable. D'après nos résultats (tableau 5.3.1), nous pouvons dire aussi, que l'hydrolyse chimique du cyclophosphamide dans le bioréacteur lors du traitement, dans nos conditions opératoires, est négligeable.

En outre, nous avons observé que l'élimination du cyclophosphamide, est influencée principalement par la concentration en MES en régime non stabilisé, puis par la concentration dans l'influent quand la concentration en MES est importante (supérieur à 7 g/L ou régime stable).

Finalement, nous pouvons conclure que les processus d'adsorption et de biodégradation contribuent à l'élimination du CP de l'eau résiduaire traitée. Toutefois, d'après notre estimation (bilan de matière), le processus le plus importante d'élimination du CP est la biodégradation. Etant données les faibles concentrations retrouvées en CP, nous supposons que la transformation par cométabolisme pourrait être le principal mécanisme de biodégradation. En outre, le cométabolisme étant un phénomène extracellulaire, il se peut que ce processus se voit favorisé davantage dans un bioréacteur à membrane grâce à la rétention des certaines enzymes par la membrane filtrante.

Les résultats obtenus sur ce projet démontrent d'une part que le procédé bioréacteur à membrane répond aux attentes d'adaptation de la biomasse à la présence de composés pharmaceutiques génotoxiques. Pourtant, l'élimination des molécules n'est pas totale et une toxicité résiduelle peut être mesurée en sortie des pilotes, probablement liée à la formation de composés toxiques dérivés des molécules induites. Une étape de traitement tertiaire s'impose (un traitement oxydatif en particulier, de type chimique comme l'ozonation, ou bien de type biologique comme des enzymes à haut pouvoir oxydant).

Dans le cadre du projet ANR « TOXEAUBAM » un traitement tertiaire a été aussi évalué. Les membranes d'osmose inverse ont une efficacité proche de 100% de rétention, et ce quelles que soient les conditions. En revanche, l'utilisation d'une membrane de nanofiltration a conduit à des rétentions faibles dans la gamme 20-40% quand le solvant est l'eau, et proche de 60% quand le solvant est le perméat du bioréacteur. L'osmose inverse possède une efficacité plus grande en termes de rétention de la CP cependant des conclusions ne pourront être tirées que lorsqu'une évaluation globale des flux entrant et sortant en filtration tangentielle aura pu être établie.

Finalement, nous mettons en évidence l'importance d'évaluer le devenir des composés pharmaceutiques non seulement dans la phase liquide mais aussi dans la phase solide. Des tests d'adsorption du CP et des ces métabolites plus rigoureux devront être mis en place dans des recherches ultérieures.

Il serait intéressant de tester d'autres moyens d'inhibition de l'activité, afin de pouvoir distinguer l'absorption de la biodégradation sans modifier la capacité absorbante de la liqueur mixte lors de la phase d'inhibition, par exemple par des composés chimiques tels que le azide (Chen et al., 2008), et le mercure(II) sulfate (Clara et al., 2004), ou bien par traitement thermique sans séchage, et d'étudier l'influence du pH et de la température, ainsi qu'étudier le phénomène d'adsorption multi-composants.

Il serait aussi intéressant d'étudier les phénomènes d'adsorption sur la phase colloïdale, plus précisément sur les substances exo polymériques solubles. Le fait que (lors de la première campagne expérimentale) l'augmentation de la cyto/génotoxicité dans le surnageant est survenue aux alentours des jours où la pression transmembranaire augmente considérablement, nous suggère que, éventuellement, des métabolites des composés pharmaceutiques pourraient être adsorbé sur les particules colloïdales. Dans un premier temps, il serait intéressant de faire des tests d'adsorption sur le surnageant (riche en substances exo polymériques solubles et possédant très peu de biomasse active) de la boue du bioréacteur après centrifugation.

Conclusions et perspectives

La problématique concernant la présence et les risques potentiels liés aux micropolluants dans l'environnement est devenue une préoccupation d'actualité. Aujourd'hui, les stations d'épuration ne sont pas en mesure de traiter de manière adéquate ce nouveau type de pollution. Par conséquent, il est nécessaire d'envisager un traitement plus efficace afin d'éliminer ces composés en amont des stations d'épuration.

L'influence des micropolluants, surtout des composés pharmaceutiques, sur les performances des procédés pour le traitement des eaux usées par voie biologique (boues activées classique, biofiltres ou bien des bioréacteurs à membrane) est à l'heure actuelle, est un sujet de recherche très peu abordé dans la littérature. Jusqu'à présent, aucun article ne discute sur l'influence de composés cytotoxiques sur la biomasse épuratrice.

Dans le cadre de cette thèse, l'application de la technologie des bioréacteurs à membrane a été envisagée afin d'évaluer leur potentiel pour la dégradation d'un médicament anticancéreux : le cyclophosphamide.

Les objectifs de cette étude ont été les suivants :

- Evaluer le potentiel des bioréacteurs à membrane pour la dégradation du cyclophosphamide, ainsi que pour l'élimination de sa toxicité.
- Rechercher l'effet du CP et de ses métabolites sur les performances globales du procédé et sur l'activité de la biomasse épuratrice ainsi que sur les propriétés physico-chimiques de la liqueur mixte et les conséquences sur le colmatage.

Dans le cadre de cette problématique, bien que l'acclimatation de la boue activée soit une étape très importante pour la dégradation de micropolluants, nous avons voulu évaluer ce qui est à priori un avantage propre des bioréacteurs à membrane pour favoriser la biodégradation des composés pharmaceutiques présents à des faibles concentrations : le fonctionnement à grands âges de boues et à fortes concentrations en biomasse.

Ainsi, deux âges de boues ont été évalués, 50 jours lors de la première campagne et 70 jours lors de la deuxième.

En réponse aux objectifs fixés, nous citons ci-dessous les principales conclusions de cette étude :

Elimination du cyclophosphamide et de la toxicité liée à ses principaux métabolites par un bioréacteur à membrane externe

Les processus d'adsorption et de biodégradation contribuent à l'élimination du CP de l'eau résiduaire traitée. Toutefois, d'après notre estimation (bilan de matière), le processus le plus important d'élimination du CP est la biodégradation. Etant données les faibles concentrations retrouvées en CP, nous supposons que la transformation par cométabolisme pourrait être le principal mécanisme de biodégradation.

Un autre résultat important est que la rétention du cyclophosphamide par l'ensemble membrane + dépôt développé sur la surface de la membrane est négligeable. D'après nos résultats, nous pouvons dire aussi, que l'hydrolyse chimique du cyclophosphamide dans le bioréacteur lors du traitement, dans nos conditions opératoires, est négligeable.

L'élimination du Cyclophosphamide (CP) et du métabolite 4-Keto-CP durant les deux campagnes expérimentales est d'environ 80% pour les deux composés, avec des variations importantes pour le pourcentage d'élimination du métabolite 4-Keto CP. Le CP serait transformé en un intermédiaire inconnu, et durant certaines périodes, ce métabolite inconnu serait transformé d'avantage en 4-Keto-CP en même temps que la toxicité du milieu devient importante.

Lors de la deuxième campagne expérimentale, les pourcentages d'élimination du CP et du 4-Keto CP, sont à peu près similaires à ceux obtenus lors de la première campagne. Selon ces résultats, il semble qu'un âge de boues de 50 jours soit suffisant pour atteindre des pourcentages d'élimination du CP favorables. L'augmentation de l'âge de boues à 70 jours n'apporte pas d'amélioration significative si ce n'est une limitation de la quantité rejetée par la purge de boues, réduite pour un âge de boues important. La question sur l'élimination du CP à des âges de boues inférieurs à 50 jours, reste toujours ouverte.

Nous avons aussi observé que l'élimination du cyclophosphamide, est influencée principalement par la concentration en MES en régime non stabilisé. Elle est aussi augmentée avec la concentration dans l'influent, probablement parce que le processus d'élimination est basé sur le cométabolisme.

Effet du CP et de ses métabolites sur les performances globales du procédé

Les performances globales d'élimination de la DCO et de l'azote total sont très similaires et élevées pour les deux bioréacteurs durant les deux campagnes expérimentales. Nous pouvons donc conclure que le cocktail de Cyclophosphamide et ces métabolites aux conditions opératoires étudiées n'a pas d'influence significative sur l'élimination globale de la DCO et de l'azote total.

Effet du CP et de ses métabolites sur l'activité de la biomasse épuratrice

Les microorganismes exposés au cocktail de cytotoxiques, montrent des taux de respiration endogène plus importants et des taux de respiration exogène inférieurs à ceux présents au sein du bioréacteur Contrôle. Les effets ne sont observés que plusieurs jours après l'ajout du cocktail. Une diminution de la production de boues du BÀM R1 CP par rapport au BÀM R2 contrôle est observée. Cette diminution de la production de boues et l'augmentation du taux de respiration endogène par rapport au BÀM R2 contrôle, suggèrent que le stress chimique causé par le cyclophosphamide et ses métabolites provoque un détournement du carbone et/ou de l'énergie de la croissance vers des réponses d'adaptation et de protection. Des résultats obtenus lors de la deuxième campagne semblent indiquer que les microorganismes (hétérotrophes) s'adaptent bien à ces micropolluants.

L'effet inhibiteur sur l'assimilation du substrat exogène (diminution du taux de respiration exogène) serait « amorti » par la forte concentration en biomasse présente dans le bioréacteur permettant de maintenir des performances globales élevées dans l'élimination de la DCO et de l'azote total. Nous pouvons supposer que, le bioréacteur fonctionnant en conditions de substrat limitant, l'effet inhibiteur pourrait affecter une partie de la population microbienne; le restant de la population toujours active augmenterait sa vitesse de respiration spécifique exogène comme conséquence d'une augmentation du substrat disponible par microorganismes actif.

En outre, la robustesse du bioréacteur à membrane externe observée est liée non seulement aux fortes concentrations en biomasse, à l'enrichissement de la population hétérotrophe et autotrophe comme conséquence des âges de boues élevés, mais aussi à la membrane filtrante qui joue un rôle important dans la rétention de solides et dans la qualité du perméat en retenant en grande partie la DCO du surnageant dans le bioréacteur.

Effet du CP et de ses métabolites sur les propriétés physico-chimiques de la liqueur mixte et les conséquences sur le colmatage.

La présence du Cyclophosphamide et ses principaux métabolites stimule les mécanismes de survie et de production des EPS avec une production légèrement plus forte des polysaccharides que des protéines (Campagne expérimentale I). L'approche Infrarouge a montré que la réponse globale IR des EPS peut être décrite comme la combinaison de trois espèces chimiques majoritaires : polysaccharides, amides ou amines et nitrates, respectivement.

Une production des EPS liés comme mécanisme de protection aux composés pharmaceutiques étudiés, est associée et mise en évidence par **l'augmentation du diamètre moyen de floccs**.

Ainsi, la toxicité du cocktail des composés pharmaceutiques sur la boue activée modifie les caractéristiques de la matrice biologique. Les résultats mettent en évidence que la réponse des boues activées des BÀM au cisaillement est dépendante de la présence de ces molécules. La boue activée du BÀM R1 CP présente des capacités d'adaptation aux stress mécanique moins robustes que celle du BÀM R2 Contrôle dans le cas d'une biomasse peu adaptée. L'effet de « la toxicité des composés cytotoxiques » combiné à des fortes contraintes de cisaillement accentue alors les phénomènes de défloculation et de libération des substances exopolymériques de floccs vers la liqueur mixte.

L'accumulation des EPS (production de polysaccharides) et la formation de petites particules est à l'origine de l'augmentation de la résistance à la filtration. Le pouvoir colmatant semble être lié plus étroitement aux polysaccharides influençant les propriétés de filtrabilité.

Bien que l'ajout des molécules toxiques entraîne une augmentation du pouvoir colmatant lors de la campagne expérimentale I, une diminution du même paramètre (produit αC) de la liqueur mixte est observée durant la deuxième campagne. Des différences dans l'état physiologique de la biomasse, et la variété du consortium microbien liées à l'augmentation du temps de rétention de boues, ainsi que l'adaptation complète de la biomasse épuratrice aux conditions opératoires utilisées (Vitesse tangentielle 5m/s) pourrait expliquer la différence observée de la réponse de la boue activée en présence du cyclophosphamide et de ses principaux métabolites lors de la seconde campagne.

Finalement nous pouvons penser que la défloculation engendrée par les contraintes de cisaillement lors de la première campagne expérimentale a mis en évidence des phénomènes qui se produisent au niveau des floes (EPS liés), devenant ainsi mesurables par nos techniques analytiques employées et leurs conséquences plus facilement remarquables sur le procédé (colmatage de la membrane). Etant donné que les micro-organismes se sont favorablement adaptés aux contraintes de cisaillement correspondant à une vitesse tangentielle de 5m/s lors de la deuxième campagne expérimentale, les phénomènes des défloculation n'ont pas eu lieu. De ce fait, nous n'avons pas pu apprécier facilement les phénomènes ayant lieu au sein des floes.

Perspectives

Nous mettons en évidence l'importance d'évaluer le devenir des composés pharmaceutiques non seulement dans la phase liquide mais aussi dans la phase solide. Des tests d'adsorption du CP et des ces métabolites plus rigoureux devront être mis en place dans des recherche ultérieures. Il serait aussi intéressant d'étudier les phénomènes d'adsorption sur la phase colloïdale, plus précisément sur les substances exo polymériques solubles, ainsi qu'étudier le phénomène d'adsorption multi-composants. La partition de micropolluants dans de boues activées est d'ailleurs un sujet de recherche en émergence.

La compréhension détaillée du comportement des produits pharmaceutiques dans le traitement des eaux résiduaires exige la considération de leurs métabolites microbiens et l'élimination de la toxicité associée à la molécule mère et/ou aux métabolites. Il serait intéressant d'évaluer la génotoxicité de la boue activée traitant le cocktail pharmaceutique. D'ailleurs, il est important d'évaluer la partition de la toxicité au sein du bioréacteur, afin de déterminer si la toxicité est complètement éliminée, ou bien déterminer dans quel compartiment de la matrice (phase liquide (soluble), et/ou phases colloïdale et/ou phase solide la toxicité est stockée.

Il faudrait déterminer si l'apport en continue des composés cytotoxiques étudiés a une influence sur la sélection de la population microbienne, à deux âges de boues différents. Ceci permettra de mieux appréhender les mécanismes d'élimination de ces composés, et éventuellement la détermination des souches bactériennes jouant un rôle important dans cette élimination permettant ainsi, l'optimisation du procédé vis-à-vis l'optimisation de la croissance et l'enrichissement de cette population au sein du bioréacteur.

Les différents problèmes résultant des rejets liquides des services de santé suscitent un questionnement sur le devenir des polluants hospitaliers dans l'environnement et sur la nécessité de développer des outils de gestion durable des eaux usées de ces établissements.

Les résultats obtenus sur ce projet démontrent d'une part que le procédé bioréacteur à membrane répond aux attentes d'adaptation de la biomasse à la présence de composés pharmaceutiques cyto/génotoxiques. Pourtant, l'élimination des molécules n'est pas totale et une toxicité résiduelle peut être mesurée en sortie des pilotes, éventuellement liée à la formation de composés toxiques dérivés des molécules induites. Une étape de traitement tertiaire s'impose, un traitement oxydatif en particulier, de type chimique comme l'ozonation (recommander par les auteurs du projet européen POSEIDON), ou bien de type biologique comme des enzymes à haut pouvoir oxydant.

L'évaluation de cette technologie (bioréacteurs à membrane) en conditions réelles sur long terme sur un effluent hospitalier, de préférence à la sortie du service d'oncologie, ou bien sur des effluents de l'industrie pharmaceutique permettra de juger finalement le potentiel à l'échelle industrielle des bioréacteurs à membrane dans l'élimination chimique des composés cytotoxiques et de leur toxicité associée. Toutefois, les bioréacteurs à membrane offrent deux avantages majeurs pour l'élimination des composés pharmaceutiques des eaux résiduaires hospitalières :

1. La conception compacte permettant son fonctionnement à l'hôpital même. De cette façon, la concentration en micropolluants dans l'influent serait importante par rapport à celle retrouvée à l'entrée des stations d'épuration. Tel que nous l'avons montré, en accord avec des études précédentes, une concentration plus élevée en micropolluants dans l'influent favorise l'élimination de ces composés.
2. La possibilité de fonctionnement à des âges de boues élevés. Dans ces conditions la quantité de boues produite est diminuée, ainsi l'élimination simultanée de la DCO et de l'azote peut être menée sous conditions opératoires choisies. En outre, dans le cas où les boues deviennent toxiques lors du traitement des eaux résiduaires hospitalières, un traitement par incinération deviendrait alors pertinent. La diminution de la quantité de boue à traiter représente donc une diminution du coût de fonctionnement.

Références Bibliographiques

A

Adams, C., Wang, Y., Loftin, K., Meyer, M.. Removal of antibiotics from surface and distilled water in conventional water treatment processes. *J. Environ. Eng.* 128, (2002), pages 253–260. (Adams et al., 2002).

Aherne GW, Hardcastle A, Nield AH. Cytotoxic drugs and the aquatic environment. Estimation of bleomycin in river and water samples, *J. Pharm. Pharmacol.*, 42, (1990), pages 741-742. (Aherne et al., 1990).

Aimar P., Sanchez V., Le colmatage des membranes d'ultrafiltration et de microfiltration. *Belgican Journal of Food Chemistry and Biotechnology* 44:6 (1989), 203-231. (Aimar et Sanchez, 1989).

Al-Ahmad A., Kümmerer k., Schöteon G.. Biodegradation and toxicity of antineoplastics mitoxantron hydrochloride and treosulfane in the close bottle test. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58, (1997), pages 704-711. (Al-Ahmad et al., 1997).

Al-Ahmad A, Kümmerer K.. Biodegradation of the antineoplastics vindesine, vincristine and vinblastine and the toxicity against bacteria in the aquatic environment, *Cancer Det. Prev.*, 25, (2001), pages 102-107. (Al-Ahmad et Kümmerer, 2001).

Andersen H.R., Hansen M., Ingerslev F., Kjolholt J., Stuer-Lauridsen F., Ternes T., Halling-Sorensen B.. Assessment of the importance of sorption for steroid estrogens removal during activated sludge treatment. *Chemosphere* 61, (2005), pages 139–146. (Andersen et al., 2005)

Andreadakis A.D.. Physical and Chemical Properties of Activated Sludge Floc. *Water Res.* 27 (1993), pages 1707-1714. (Andreadakis, 1993).

Andreozzi, R., Raffaele, M. and Nicklas, P.. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50 (2003), pages 1319-1330. (Andreozzi et al., 2003)

Anway M.D., Cupp A. S., Uzumcu M., Skinner M.K.. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* (2005), 308, 1466-9.

Artola-Garicano E., Borkent I., Damen K., Jager T., Vaes W.H.J.. Sorption kinetics and microbial biodegradation activity of hydrophobic chemicals in sewage sludge: model and measurements based on free concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003), 116–122. (Artola-Garicano et al., 2003)

B

Bae T.H., Tank T.M.. Interpretation of fouling characteristics of ultrafiltration membranes during the filtration of membrane bioreactor mixed liquor. *J. Membr. Sci.* 264, (2005), 151-160. (Bae et Tank, 2005).

Barth, E. F.; Ettinger, M. G.; Salotto, B. V.; McDermott, G. N. Summary report on the effects of heavy metals on the biological treatment processes. *J. Water Pollut. Control Fed.* 37, (1965), page 86. (Barth et al., 1965).

Beausse J.. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trac-Trends Anal. Chem.* 23, (2004), pages 753–761. (Beausse, 2004).

Bekbolet, M., Yenigun, O., Yucel, I.. Sorption studies of 2,4-D on selected soils. *Water Air Soil Pollut.* 111 (1999), pages 75–88.

Bernhard M, Müller J, Knepper T. P.. Biodegradation of persistent polar pollutants in wastewater: Comparison of an optimised lab-scale membrane bioreactor and activated sludge treatment. *Water Research* 40 (2006) 3419-3428. (Bernhard et al., 2006)

Beyenal, N. Y.; Ozbelge, B.; Tualy, A.; Ozbelge, H. Combined effects of Cu²⁺ and Zn²⁺ on activated sludge process. *Water Res.* 31 (1977), page 699. (Beyenal et al., 1977).

Bitton Gabriel. *Wastewater microbiology*. Chapter 18. Page 333-335. Wiley-Liss. (1994). (Bitton, 1994).

Boerlage S.F.E., Kennedy M.D., Dickson M.R., El-Hodali D.E.Y., Schippers J.C.. The modified fouling index using ultrafiltration membranes (MFI-UF): characterization, filtration mechanisms and proposed reference membrane, *J. Membr. Sci.* 197 (2002) 1.

Boreen, A. L., Arnold, W. A. and McNeill, K.. Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: A review. *Aquat. Sci.*, 65 (2003), 320-341. (Boreen et al., 2003).

Bowman J.C., Zhou J.L., Readman J.W.. Sediment–water interactions of natural oestrogens under marine conditions. *Mar. Chem.* 77, (2002), pages 263–276. (Bowman et al., 2002).

Boxall A. B. A., Koplin D. W., Sorensen B. H., Tolls J.. Are veterinary medicines causing environmental risk? *Environ. Sci. Technol.* 37, (2003), 287-294.

Brooke D et al. (1973). Chemical stability of cyclophosphamide in parental solutions. *Am. J. Hosp. Pharm.* 30, 134-137.

Brooks, B. W., Chambliss, C. K., Stanley, J. K., Ramirez, A., Banks, K. E., Johnson, R. D. Lewis, R. J.. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24 (2005), 464-469. (Brooks et al., 2005).

Brooks, B. W., Turner, P. K., Stanley, J. K., Weston, J. J., Glidewell, E. A., Foran, C. M., Slattery, M., La Point, T. W. and Huggett, D. B.. Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. *Chemosphere*, 52 (2003), 135-142. (Brooks et al., 2003).

Buerge I. J., Buser H. R., Poiger T., Müller M. D.. Occurrence and fate of the Cytostatic Drugs Cyclophosphamide and ifosfamide in Wastewater and surface Waters. *Environ. Sci. Technol.* 40, (2006), 7242-7250. (Buerge et al., 2006).

Bura R., Cheung M., Liao B., Finlayson J., Lee B.C, Droppo I.G., Leppard G.G., Liss S.N. Composition of extracellular polymeric substances in the activated sludge floc matrix. *Water Science and Technology* 37 (1998), pages 325-333.

Buser, H.-R.; Müller, M. D.; Theobald, N., Occurrence of the Pharmaceutical Drug Clofibric Acid and the Herbicide Mecoprop in Various Swiss Lakes and in the North Sea. *Environ. Sci. Technol.* 32, (1998), pages 188-192. (Buser et al, 1998).

Buser, H.R., Poiger, T., Muller, M.D.. Occurrence and environmental behaviour of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 33, (1999), pages 2529-2535. (Buser et al., 1999).

Byrns, G. The fate of xenobiotic organic compounds in wastewater treatment plants. *Water Res.* 35 (2001), 2523. (Byrns, 2001).

C

Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R. and Fanelli, R.. A strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in northern Italy. *Environ. Sci. Technol.*, 37 (2003), 1241-1248. (Calamari et al., 2003).

Carballa M., Fink G., Omil F., Lema J.M., Ternes T.. Determination of solid-water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals, estrogens and musk fragrances in digested sludge. *Water research*. (2007). Article in press. (Carballa et al., 2007).

Carlsson, C., Johansson, A.-K., Alvan, G., Bergman, K. and Kuhler, T.. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part 1: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci. Total Environ.*, 364 (2006), 67-86. (Carlsson et al., 2006).

Castiglioni S., Bagnati R., Calamari D., Fanelli R., Zuccato E.. A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and HPLC-MS-MS to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban waste waters. *J. Chromatogr.* 1092, (2005), pages 206-215. (Castiglioni et al., 2005).

Castiglioni S., Bagnati R., Fanelli R., Pomati F., Calamari D., Zuccato E.. Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environ. Sci. Technol.* 40,(2006) pages 357-363. (Castiglioni et al., 2006).

Chang I.S, Le-Clech P., Jefferson B., Judd S.J.. Membrane fouling in membrane bioreactors for wastewater treatment. *J. Environ. Eng.* 128 (2002), 1018-1029.

Chen J., Huang X., Lee D.. Bisphenol A removal by a membrane bioreactor. *Process Biochemistry* (2008), pages 451-456. (Chen et al., 2008).

Chu H.P., Li X.Y.. Membrane fouling in a membrane bioreactor (MBR): sludge cake formation and fouling characteristics, *Biotechnol. Bioeng.* 90 (2005) 323–331. (Chu et al., 2005).

Clara M., Strenn B., Saracevic E., Kreuzinger N.. Adsorption of bisphenol-A, 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol to sewage sludge. *Chemosphere* 56, (2004), pages 843–851. (Clara et al., 2004).

Clara M., Strenn B., Gans O., Martinez E., Kreuzinger N., Kroiss H.. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Research* 39 (2005a) 4797-4807. (Clara et al., 2005a).

Clara M., Kreuzinger N., Strenn B., Gans O., Kroiss H.. The solids retention time – a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Research* 39 (2005b) 97-106. (Clara et al., 2005b).

Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P.. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 284 (1999) pages 1318-1322. (Costerton et al., 1999).

D

Daughton C. and Ternes T.A.. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives* 107 (1999) 907-938. (Daughton et Ternes, 1999).

Davis E.M. Protein assays: a review of common techniques. *Am. Biotechnol. Lab*, 7 (1988), 28-37.

De Wever H., Van Roy S., Dotremont C., Müller J., Knepper T.. Comparison of linear alkybenzene sulfonates removal in conventional activated sludge systems and membrane bioreactor. *Water Sci. Technol.* 50 (2004) 219-225. (De Wever et al., 2004).

De Wever H., Weiss S., Reemtsma T., Vereecken J., Müller J., Knepper T., Röden O., Gonzalez S., Barcelo D., Hernando M. D.. Comparison of sulfonated and other micropollutants removal in membrane bioreactor and conventional wastewater treatment. *Water research* 41 (2007) 935-945. (De Wever et al., 2007).

Defrance Laure, Jaffrin Michel Y., Gupta Bharat, Paillier Patrick, Geaugey Valery. Contribution of various constituents of activated sludge to membrane bioreactor fouling. *Bioresource Technology* 73 (2000) 105-112. (Defrance et al., 2000).

Della Greca M., Fiorentino A., Isidori M., Lavorigna M., Previtera L., Rubino M., Temussi F.. Toxicity of prednisolone, dexamethasone and their photochemical derivatives on aquatic organisms, *Chemosphere*, 54 (2004) 629-637. (Della Greca et al., 2004).

Di Guardo A., Calamari D., Benfenati E., Hallin-Sorensen B., Zuccato E., Fanelli R.. In *Pharmaceuticals in the Environment* ; Kümmerer K. Ed. Springer : Berlin, Germany, (2001) ; pp 91-102. (Di Gaurdo et al., 2001).

Dignac M.F., Urbain V., Rybacki D., Bruchet A., Snidaro D., Scribe P.. Chemical Description of Extracellular Polymers: Implication on Activated Sludge Floc Structure. *Water Sci. Technol.* **38** (1998), pages 45-53. (Dignac et al., 1998)

Dionisi, D.; Bertin, L.; Bornoroni, L.; Capodicasa, S.; Petrangeli Papini, M.; Fava, F. Removal of organic xenobiotics in activated sludges under aerobic conditions and anaerobic digestion of the adsorbed species. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81 (2006), 1496. (Dionisi et al., 2006).

Dionisi D., Levantesi C., Majone M., Bornoroni L., De Sanctis M.. Effect of Micropollutants (Organic Xenobiotics and heavy metals) on the Activated Sludge Process. Ind. Eng. Cham. Res. 46, (2007), pages 6762-6769. (Dionisi et al., 2007).

Doll, T. E. and Frimmel, F. H.. Fate of pharmaceuticals-photodegradation by simulated solar UV- light. Chemosphere, **52** (2003), 1757-1769. (Doll et Frimmel, 2003).

Dreywood R.. Qualitative test for the carbohydrate material. Industrial Engineering Chemistry. 18, (1946), 499.

Drews A., Vocks M., Iversen V., Lesjean B. Kraume M., 2006. Influence of unsteady membrane bioreactor operation on EPS formation and filtration resistance. Desalination 192, 1-9. (Drews at al., 2006).

During R.A., Krahe S., Gath S.. Sorption behaviour of nonylphenol in terrestrial soils. Environ. Sci. Technol. 36 (2002), pages 4052–4057.(During et al., 2002).

F

Fent, K., A.A. Weston and D. Caminada. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquat. Toxicol. (2006). 76: 122-159. (Fent et al., 2006).

Ferrari, B., Paxeus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A. and Garric, J.. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. Ecotoxicol. Environ. Safety, 56 (2003), 359-370. (Ferrari et al., 2003).

Flaherty, C. M. and Dodson, S. I.. Effect of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. Chemosphere, 61(2005), 200-207. (Flaherty et al., 2005).

Frolund B., Griebe T., Nielsen O.H. Enzymatic activity in the activated sludge flocs matrix. Applied Microbiology and Biotechnology. 43 (1995), 755-761. (Frolund et al., 1995).

Frost and Sullivan. Strategic Analysis of the European Membrane Bioreactor Markets, July 2005.

G

Gander M., Jefferson B., Judd S.. Aerobic MBRs for domestic wastewater treatment: a review with cost considerations. Separation Purification Technology 18 (2000), 119-130.

Garric J., Ferrari B.. Les substances pharmaceutiques dans les milieux aquatiques. Niveaux d'exposition et effet biologique : que savons nous ?. Revue des sciences de l'eau. 18/3 (2005), pages 307 – 330. (Garric et Ferrari, 2005).

Giger W., Alder A.C., Golet E.M., Kohler H.P.E., McArdell C.S., Molnar E., Siegrist H., Suter M.J.F. Occurences and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewater, sewage sludges, and surface waters. (2003). Chimia 57, 485-491. (Giber et al., 2003).

Gilard V., Martino R., Malet-Martino M.C., Kutscher B., Müller A., Niemeyer U., Pohl J., Polymeropoulos E.E. (1994). Chemical and biochemical evaluation of hydrolysis products of cyclophosphamide. *J. Med. Chem.* 37, 3986-3993. (Gilard et al., 1994).

Göbel, A., Thomsen, A., McArdell, C.S., Joss, A., Giger, W.. Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides and trimethoprim in conventional activated sludge treatment. *Env. Sci. Tech.* 39, (2005), pages 3981–3989.

Golet E.M., Xifra I., Siegrist H., Alder A.C., Giger W.. Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003), 3243–3249. (Golet et al., 2003).

Gonzalez S., Mülles J., Petrovic M., Barcelo D., Kenepper T.. Biodegradation studies of selected priority acidic pesticides and diclofenac in different bioreactors. *Environmental Pollution* 144 (2006a) 926-932. (Gonzalez et al., 2006a).

Gonzales, S., Petrovic M., Barcelo D.. Removal of broad range of surfactants from municipal wastewater –comparison between membrana bioreactor and conventional activated sludge treatment. *Chemosphere*, (2006b). 7698 (in press). (Gonzalez et al., 2006b).

Goss K.U., Schwarzenbach R.P.. Linear free energy relationships used to evaluate equilibrium partitioning of organic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 35, (2001), pages 1–9. (Goss et Schwarzenbach, 2001).

Gros, M.; Petrovic, M.; Barcelo, D., Multi-residue analytical methods using LC-tandem MS for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2006), 386, (4), 941-952. (Gros et al, 2006).

Guibaud G., Comte S., Bordas F., Dupuy S., Baudu M.. Comparison of the Complexation Potential of Extracellular Polymeric Substances (EPS) Extracted from Activated Sludges and Produced by Pure Bacteria Strains, for Cadmium, Lead and Nickel. *Chemosphere* 59 (2005), pages 629-638. (Guibaud et al., 2005).

H

Halling-Sørensen B., Nors Nielsen S., Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten Lützhøft H.C., Jørgensen S.E.. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere*. Vol. 36, Issue 2, (1998), Page 357-393. (Halling-Sørensen et al., 1998)

Han Sung-Soo, Bae Tae-Hyun, Jang Gyung-Gug, Tak Tae-Moon. Influence of sludge retention time on membrane fouling and bioactivities in membrane bioreactor system. *Process Biochemistry* 40 (2005) 2393-2400. (Han Sung-Soo et al., 2005).

Hannon J.A., Lopez C., Madec M.N., Lortal S.. Altering renneting pH changes microstructure, cell distribution and lysis of *Lactococcus lactis* AM2 in cheeses made from ultrafiltered milk. *Journal of dairy science*. 89 (2006), 812-823. (Hannon et al., 2006).

Heberer T. Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131 (2002) (1-2), 5-17. (Heberer, 2002).

Heberer T., Dünnebier U., Reilich C. and Stan H.J.. Detection of drugs and drug metabolites in ground water samples of a drinking water treatment plant. *Fresenius Environmental Bulletin* 6 (1997) 438-443. (Heberer et al., 1997).

Henriques Ines D.S., Holbrook David, Kelly II Richard T., Love Nancy G.. The impact of flocs size on respiration inhibition by soluble toxicants – a comparative investigation. *Water Research* 39 (2005) 2559-2568. (Henriques et al., 2005).

Henriques Inês D S., Love Nancy G.. The role of extracellular polymeric substances in the toxicity response of activated sludge bacteria to chemical toxins, *Water Research* (2007), doi:10.1016/j.watres.2007.05.001. (Henriques et Love, 2007).

Henry, T. B., Kwon, J. W., Armbrust, K. L. and Black, M. C.. Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **23** (2004), 2229-2233. (Henry et al., 2004).

Henze M., Grady C.P.L.J., Gujer W., Marais G.R., Matsuo T.. Activated Sludge Model No. 1. In *IAWPRC Scientific and Technical Report No. 1*, IAWPRC, London, 1987. (Henze et al., 1987)

Hermia J.. Constant pressure blocking filtration laws-Application to power-law non- newtonian fluids. *Trans. I. Chem. E* 60 (1982), 183-187. (Hermia, 1982).

Hernandez Rojas M.E., Van Kaam R., Schetrite S. Albasi C.. Role and variation of supernatant compounds in submerged membrane bioreactor fouling. *Desalination* 179 (2005) 95-107. (Hernandez Rojas et al., 2005).

Hernando M.D., M. Mezcuca, A.R. Fernández-Alba and D. Barceló. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69 (2006), pages 334-342.

Higgins M.J., Novak J.T.. The Effect of Cations on the Settling and Dewatering of Activated Sludges: Laboratory Results. *Water Environ. Res.* 69 (1997a), pages 215-224. (Higgins et Novak, 1997a).

Higgins M.J., Novak J.T.. Characterization of Exocellular Protein and Its Role in Bioflocculation. *J. Environ. Eng.-ASCE* 123 (1997b), pages 479-485. (Higgins et Novak, 1997b).

Hirsch R, Ternes T, Haberer K, Kratz KL.. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci Total Environ* (1999).225:109-118. (Hirsch et al., 1999).

Holbrook R.D., Love N.G., Novak J.T.. Sorption of 17βestradiol and 17α-ethinylestradiol by colloidal organic carbon derived from biological wastewater treatment systems. *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004), 3322–3329. (Holbrook et al., 2004)

Holthaus K.I.E., Johnson A.C., Jurgens M.D., Williams R.J., Smith J.J.L., Carter J.E.. The potential for estradiol and ethinylestradiol to sorb to suspended and bed sediments in some English rivers. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, (2002), pages 2526–2535.

Huang Xia, Ping Gui and Yi Qian . Effect of sludge retention time on microbial behaviour in a submerged membrane bioreactor. *Process Biochemistry*. Volume 36, Issue 10 , April 2001, Pages 1001-1006. (Huang Xia et al., 2001).

Huber, M.M., Canonica, S., Park, G.Y., von Gunten, U..Oxidation of pharmaceuticals during ozonation and advanced oxidation processes. *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003), pages 1016–1024. (Huber et al., 2003).

Huber, M.M., Göbel, A., Joss, A., Hermann, N., Löffler, D., McArdell, C.S., Ried, A., Siegrist, H., Ternes, T.A., von Gunten, U.. Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: a pilot study. *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005), pages 4290–4299. (Huber et al., 2005).

Huber M.M., Ternes T., Von Guten U.. Removal of estrogenic activity and formation of oxidation products during ozonation of 17 α -ethinylestradiol, *Environ. Sci. Technol.*, 38 (2004), pages 5177-5186. (Huber et al., 2004)

Huitema Alwin D.R., Reinders Cindy, Tibben Matthijs M., Rodenhuis Sjoerd, Beijnen Jos H.. Sensitive gas chromatographic determination of the cyclophosphamide metabolite 2-dechloroethylcyclophosphamide in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 757 (2001) 349–357. (Huitema et al., 2001).

Huschek G, Hansen PD, Maurer HH, Kregel D, Kayser A.. Environmental risk assessment of medicinal products for human use according to European commission recommendations. *Environ Toxicol* 19 (2004), 226-240. (Huschek et al., 2004).

I

IARC. Some Aziridines, *N*-, *S*-, and *O*-Mustards and Selenium. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 9. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. (1975) 286 pp.

IARC. Some Antineoplastic and Immunosuppressive Agents. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, overall evaluations of the carcinogenicity: An updating of IARC Monographes. Volumes I-42. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. (1987).

IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 26. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. (1981) 411 pp.

J

Jiang T., Kennedy M.D., Van der Meer W.G.J., Vanrolleghem P.A., Schippers J.C.. The role of blocking and cake filtration in MBR fouling, *Desalination*, 157 (2003), 335-343. (Jiang et al., 2003).

Jianlong W., Yi Q., Horan N., Stentiford E.. Bioadsorption of pentachlorophenol (PCP) from aqueous solution by activated sludge biomass. *Bioresource Technology* 75 (2000), pages 157-161. (Jianlong et al., 2000).

Jinhua P., Fukushi K., Yamamoto K.. Structure of microbial communities on membrane surface in a submerged membrane bioreactor. *Water Environment-Membrane Technology*, Congrès Séoul. (2004).

Johnson Andrew C., Jürgens Monika D., Williams Richard J., Kümmerer Klaus, Kortenkamp Andreas, Sumpter John P.. Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. *Journal of Hydrology* (2008) 348, 167– 175. (Johnson et al, 2008).

Jolibois B., Goullé J.P., Geubert M. Efficacité de deux stations d'épuration pour éliminer la génotoxicité d'eaux usées urbaines. Actes du Congrès, Les effluents liquides des établissements de santé : Etat des lieux et perspectives de gestion. 26 et 27 novembre 2008. Chambéry, France.

Jones, O. A., Lester, J. N. and Voulvoulis, N. Pharmaceuticals: a threat to drinking water? *Trends Biotechnol.*, **23** (2005): 163-167. (Jones et al., 2005).

Jones O.A.H., Voulvoulis N., Lester J.N.. Human pharmaceuticals in the aquatic environment : a review. *Environ. Technol.* 22 (2001), 1383-1394. (Jones et al., 2001).

Jones, O. A. H., Voulvoulis, N. and Lester, J. N.. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Res.*, 36 (2002), 5013-5022. (Jones et al., 2002).

Joqueviel C., Martino R., Gilard V., Malet-Martino M., Canal P., Niemeyer U.. Urinary excretion of cyclophosphamide in humans, determined by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Drug metabolism and Disposition* 26 (1998), 418-428. (Joqueviel et al., 1998).

Jorand F., Boue-Bigne F., Block J.C., Urbain V.. Hydrophobic/Hydrophilic Properties of Activated Sludge Exopolymeric Substances. *Water Sci.Technol.* 37 (1998): pages 307-315. (Jorand et al., 1998).

Jorand F., Zartarian F., Thomas F., Block J.C., Bottero J.Y., Villemin G., Urbain V., Manem J.. Chemical and Structural (2D) Linkage Between Bacteria Within Activated Sludge Flocs. *Water Res.* 29 (1995), pages 1639-1647. (Jorand et al., 1995)

Joss A., Andersen H., Ternes T., Richle P.R., Siegrist H.. Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: consequences for plant optimisation. *Environ. Sci. Technol.* 38, (2004), 3047-3055. (Joss et al., 2004).

Joss A., Keller E., Alder A. C., Göbel A., McArdell C. S., Ternes T., Siegrist H.. Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water research* 39 (2005) 3139-3152. (Joss et al., 2005).

Joss A., Zabczynski S., Göbel A., Hoffmann B., Löffler D., McArdell C. S., Ternes T., Thomsen A., Siegrist H.. Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. *Water research* 40 (2006) 1686-1696. (Joss et al., 2006).

Joyeux Michel. Résidus médicamenteux et risques sanitaires d'origine hydrique. *Environnement, Risques & Santé* Vol.5, n°4, juillet-août 2006. (Joyeux, 2006).

Jorgensen S.E., Halling-Sorensen B.. Drugs in the environment. *Chemosphere* 40 (2000), pages 691-699. (Jorgensen et Halling-Sorensen, 2000).

Judd S. A review of fouling of membrane bioreactors in sewage treatment. *Water Science and Technology*, 49 (2004), 229-235. (Judd, 2004).

K

Kargi, F.; Uygur, A.; Baskaya, H. S. para-Chlorophenol inhibition on COD, nitrogen and phosphate removal from synthetic wastewater in a sequencing batch reactor. *Bioresour. Technol.* 96 (2005), page 1696. (Kargi et al., 2005).

Kiffmeyer, T., Götze, H.J., Jursch, M., Lüders, U.. Trace enrichment, chromatographic separation and biodegradation of cytostatic compounds in surface water. *Fresenius J. Anal. Chem.* (1998), 361, 185-191. (Kiffmeyer et al., 1998).

Kim Jae-Seok, Lee Chung-Hak, Chang In-Soung. Effect of pump shear on the performance of a crossflow membrane bioreactor. *Water Research* Vol. 35 No. 9, pp 2137-2144 (2001). (Kim Jae-Seok et al., 2001).

Kim S., Cho J., Kim In S., Vanderford B. J., Snyder S.A.. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Research* 41 (2007), 1013 – 1021. (Kim et al., 2007).

Kimura K., Hara H., Watanabe Y.. Removal of pharmaceutical compounds by submerged membrane bioreactors (MBRs). *Desalination* 178 (2005) 135-140. (Kimura et al., 2005).

Kimura K., Hara H., Watanabe Y.. Elimination of Selected Acidic Pharmaceuticals from Municipal Wastewater by an Activated Sludge System and Membrane Bioreactors. *Environ. Sci. Technol.* 41, (2007), pages 3708-3714. (Kimura et al., 2007).

Kloepfer A., Gnirss R., Jekel M., Reemtsma T.. Occurrence of benzothiazoles in municipal wastewater and their fate in biological treatment. *Water sci. Technol* 50 (2004) 203-208. (Kloepfer et al., 2004).

Kolpin, D. W.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.; Thurman, E. M.; Zaugg, S. D.; Barber, L. B.; Buxton, H. T., Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* (2002), 36, 1202-1211. (Kolpin et al., 2002).

Kong, Z., Vanrolleghem, P.A., Verstraete, W. Simultaneous determination of inhibition kinetics of carbon oxydation and nitrification with a respirometer. *Water Research.* 30(1996)825-836.

Kümmerer K.. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere* 45, (2001), 957-969. (Kümmerer, 2001).

Kümmerer K, Al-Ahmad A.. biodegradability of the anti-tumour agents 5-Fluorouracil, cytarabine and gemcitabine: Impact of the chemical structure and synergistic toxicity with hospital effluents. *Acta Hydrochim. Hydriobiol.* 25, (1997), page 166-172. (Kümmerer et Al-Ahmad, 1997).

Kümmerer K, Al-Ahmad A, Bertram B, WieBler M.. Biodegradability of antineoplastic compounds in screening test: influence of glucosidation and of stereochemistry, *Chemosphere*, 40, (2000), page 767-773. (Kümmerer et al., 2000).

Kümmerer K., Steger-Hartmann, T., Meyer, M. Biodegradability of the anti-tumor agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. *Water Res.* (1997), 31, 2705-2710. (Kümmerer et al., 1997).

L

Lacoste, B., Drakides, C., Rumeau, M.. Traitement des eaux usées sur membranes minérales par couplage de microfiltration ou ultrafiltration et systèmes biologiques en aérobie. *Proc. Interfiltra 92*, Paris, pp. 287-292. 1992. (Lacoste et al., 1992).

Lambert S. Etude structurale des agrégats bactériens : conséquences sur l'activité biologique et sur la décantation. Thèse de doctorat, Université des sciences d'Aix-Marseille 3 (2000).

Lange R., Hutchinson T.H., Croudace C.P., Siegmund F., Schweinfurth H., Hampe P., Panter G.H., Sumpter J.P.. Effects of the synthetic estrogen 17 alpha-ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol.Chem.* 20 (2001), 1216-1227.

LaPara Timothy M., Klatt Christian G., Chen Ruoyu. Adaptations in bacterial catabolic enzyme activity and community structure in membrane-coupled bioreactors fed simple synthetic wastewater. *Journal of biotechnology* 121 (2006) 368-380. (LaPara et al., 2006).

Lapasin R., Prici S.. Rheology of industrial polysaccharides: Theory and applications. 1st ed., Blackie academic & professional, London, New York. 1995. (Lapasin et al., 1995).

Laurent L., Junter G.A.. Diffusion of dextran through microporous membrane filters. *J. Membr. Sci.* 88 (1994) 253-261. (Laurent et Junter, 1994).

Le-Clech P., Chen V., Fane T.A.G.. Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *Journal of Membrane Science* 284 (2006) 17–53. (Le-Clech et al., 2006).

Lee W., Kang S., Shin H. Sludge Characteristics and their contribution to microfiltration in submerged membrane bioreactors. *Journal of membrane Science*, 216, (2003), pages 217-227. (Lee et al., 2003).

Lenz K., Hann S., Koellensperger G., Stefánka Z., Stingeder G., Weissenbacher N., Mahnik S.N., Fuerhacker M.. Presence of cancerostatic platinum compounds in hospital wastewater and possible elimination by adsorption to activated sludge. *Sci. Total. Environ.* 345, (2005), pages 141–152. (Lenz et al., 2005).

Lenz K., Koellensperger G., Hann S., Weissenbacher N., Mahnik S.N., Fuerhacker M.. Fate of cancerostatic platinum compounds in biological wastewater treatment of hospital effluents. *Chemosphere* 69 (2007), pages 1765–1774. (Lenz et al., 2007).

Leriche V., Briandet R., Carpentier B.. Ecology of Mixed Biofilms Subjected Daily to a Chlorinated Alkaline Solution: Spatial Distribution of Bacterial Species Suggests a Protective Effect of One Species to Another. *Environ. Microbiol.* 5 (2003), pages 64-71. (Leriche et al., 2003).

Lesjean B, Gnirss R., Adam C.. Process configuration adapted to membrane bioreactors for enhanced biological phosphorous and nitrogen removal. *Desalination* 149 (2002), 217-224.

Lesjean B., Gnirss R., Buisson H., Keller S., Tazi-pain A., Luck F.. Outcomes of a 2-years investigation on enhanced biological nutrients removal and trace organics elimination in membrane bioreactor (MBRs). In: Proceedings of IWA Conference, Marrakech, Morocco, IWA Publishing, London, UK, 19-24 September 2004. (Lesjean et al., 2004).

Lesjean B., Rosenberger S., Schrotter J.C. Membrane-aided biological wastewater treatment – an overview of applied systems. *Membr. Technol.* 8,(2004b), 5-10. (Lesjean et al., 2004b).

Lesjean B., Rosenberger S., Laabs C., Jekel V., Gnirss R., Amy G.. Correlation between membrane fouling and soluble/colloidal organic substances in membrane bioreactors for municipal wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* 51 (2005) 1–8. (Lesjean et al., 2005)

Lesjean B., Huisjes E.H.. Survey of European MBR market, trends and perspectives. *Desalination* 231 (2008), 71-81.

Liao B.Q., Allen D.G., Droppo I.G., Leppard G.G., Liss S.N.. Surface Properties of Sludge and Their Role in Bioflocculation and Settleability. *Water Res.* 35 (2001), pages 339-350. (Liao et al., 2001).

Lishman, L., Smyth, S. A., Sarafin, K., Kleywegt, S., Toito, J., Peart, T., Lee, B., Servos, M., Beland, M., Seto, P.. Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Sci. Total Environ.*, 367 (2006), 544-558. (Lishman et al., 2006)

Liu Y., Lam M.C., Fang H.H.P.. Adsorption of Heavy Metals by EPS of Activated Sludge. *Water Sci. Technol.* 43 (2001), pages 59-66. (Liu et al., 2001).

Liu Y. et Tay J.H.. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research*, 36 (2002), 1653-1665. (Liu et Tay, 2002).

Loichot, C. Les anticancéreux cytotoxiques. Faculté de Médecine de Strasbourg, Module de Pharmacologie Clinique DCEM3 2005/2006. Mise à jour : Janvier 2006.

Lübbecke S., Vogelpohl A., Dewjanin W.. Wastewater treatment in a biological high performance system with high biomass concentration. *Wat. Res.* 29 (1995), 793-802.

M

Mah T.F.C., O'Toole G.A.. Mechanisms of Biofilm Resistance to Antimicrobial Agents. *Trends Microbiol.* 9 (2001), pages 34-39. (Mah et O'Toole, 2001)

Mahnik S.N., Lenz K., Weissenbacher N., Mader R.M., Fuerhacker M. Fate of 5-fluorouracil, doxorubicin, epirubicin, and daunorubicin in hospital wastewater and their elimination by activated sludge and treatment in a membrane-bio-reactor system. *Chemosphere* 66 (2007) pages 30–37. (Mahnik et al., 2007).

Massé Anthony. Bioréacteurs à membranes immergées pour le traitement des eaux résiduaires urbaines : spécifités physico-chimiques du milieu biologique et colmatage. Thèse de doctorat, INSA Toulouse (2004).

Matsumoto F.E, Colus I.M.S.. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulphate. Gen. Mol. Biol. (2000), 23, 489-492. (Matsumoto, Colus, 2000).

Meng F., Zhang H., Yang F., Zhang S., Li Y., Zhang X.. Identification of activated sludge properties affecting membrane fouling in submerged membrane bioreactors. Sep. Purif. Technol. 51,(2006) 95-103. (Meng et al., 2006).

Miao, X.S., Metcalfe, C.D.. Determination of carbamazepine and its metabolites in aqueous samples using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. Anal. Chem. 75, (2003), pages 3731-3738. (Miao et al., 2003).

Mimeault, C., Woodhouse, A., Miao, X. S., Metcalfe, C. D., Moon, T. W. and Trudeau, V. L..The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish, *Carassius auratus*. Aquat. Toxicol., 73 (2005), pages 44-54. (Mimeault et al., 2005).

Moldovan, Z.. Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. Chemosphere, 64 (2006), pages1808-1817. (Moldovan, 2006)

Moore M.J. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. Clin. Pharmacokinet 20, (1991), 1994-208. (Moore, 1991).

N

Nataraj S, Schomäcker R., Kraume M., Mishra I.M., Drews A.. Analyses of polysaccharide fouling mechanisms during crossflow membrane filtration. Journal of Membrane Science 308 (2008) 152–161. (Nataraj et al., 2008)

Nau H., Spielmann H., Mortler L.T., Winckler K., Riedel L., Obe G.. Mutagenic, teratogenic and pharmacokinetic properties of cyclophosphamide and some of its deuterated derivatives. Mutat. Res. 95, (1982), 105-118.

Nikolaou A., Meric S., Fatta D. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. Anal Bioanal Chem 387 (2007), pages 1225–1234.

Nowak, O., Shweighofer, P., Svoldal, K. Nitrification inhibition- a method for the estimation of actual maximum autotrophic growth rates in activated sludge systems. Water Science and Technology. 30(1994)9-19. (Nowak et al., 1994).

Nuengjamnong Ch., Kweon J.H., Cho J., Polprasert Ch., Ahn K-H.. Membrane fouling caused by extracellular polymeric substances during microfiltration processes. Desalination 179, (2005), 117-124. (Nuengjamnong et al., 2005).

Nunes, B., Carvalho, F. and Guilhermino, L.. Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*. Ecotoxicol. Environ. Safety, 61 (2005), pages 413-419. (Nunes et al., 2005).

O

Ognier S., Wisniewski C., Grasmick A. Characterisation and modelling of fouling in membrane bioreactors. Desalination, 146, (2002), 141-147. (Ognier et al., 2002).

P

Paxeus, N., Removal of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), gemfibrozil, carbamazepine, beta-blockers, trimethoprim and triclosan in conventional wastewater treatment plants in five EU countries and their discharge to the aquatic environment. *Water Science and Technology* 50, (2004), pages 253-260. (Paxeus, 2004).

Peck M, Gibson RW, Kortenkamp A, Hill EM.. Sediments are major sinks of steroidal estrogens in two United Kingdom rivers. *Environ Toxicol Chem* 23: (2004), pages 945-952. (Peck et al., 2004).

Petrovic N., Gonzales S., Barcelo D.. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends Anal. Chem* 22 (2003), pages 685-696. (Petrovic et al., 2003).

Pettet, A. E. J. Effects in metal finishing wastes on sewage purification. *Bull. Inst. Met. Finish.* 5, (1956), page 225. (Pettet, 1956).

Pinkston, K.E., Sedlak, D.L.. Transformation of aromatic ether- and amine-containing pharmaceuticals during chlorine disinfection. *Environ. Sci. Technol.* 38, (2004) 4019–4025. (Pinkston et Sedlak, 2004).

Poerschman J., Kopinke F.D.. Sorption of very hydrophobic organic compounds (VHOCs) on dissolved humic organic matter (DOM). 2. Measurement of sorption and application of a flory-huggins concept to interpret the data. *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001), pages 1142–1148. (Poerschman et Kopinke, 2001).

Pomati F., Netting A. G., Calamari D., Neilan B. A.. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. *Aquat. Toxicol.* 67,(2004), pages 387-396. (Pomati et al., 2004).

Pomati F., Castiglioni S., Zuccato E., Fanelli R., Vigetti D., Rossetti C., Calamari D.. Effects of a Complex Mixture of Therapeutic Drugs at Environmental Levels on Human Embryonic Cells *Environ. Sci. Technol.* 40, (2006), pages 2442-2447. (Pomati et al., 2006).

Poseidon, 2005. Thomas Ternes, Adriano Joss, Norbert Kreuzinger, Korneliusz Miksch, Juan M. Lema, Urs von Gunten, Christa S. McArdell, Hansruedi Siegrist. REMOVAL OF PHARMACEUTICALS AND PERSONAL CARE PRODUCTS: RESULTS OF THE POSEIDON PROJECT. POSEIDON—Final Report, <http://www.eu-poseidon.com>

Q

Quintana José Benito, Weiss Stefan, Reemtsma Thorsten. Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Research* 39 (2005), pages 2654-2664. (Quintana et al., 2005).

R

Radjenovic J., Petrovic M., Barceló D.. Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor. *Anal Bioanal Chem* (2007) 387:1365–1377. (Radjenovic et al., 2007).

Ray S., Peters C.A. Changes in microbiological metabolism under chemical stress. *Chemosphere* 71 (2008) 474–483. (Ray et Peters, 2008).

Reddersen, K., Heberer, T., Dunnbier, U.. Identification and significance of phenazone drugs and their metabolites in ground- and drinking water. *Chemosphere*, 49 (2002), pages 539-544. (Reddersen et al., 2002).

Reemtsma T., Zywicki B., Stueber M., Kloepper A., Jekel M..Removal of sulfure-organic polar micropollutants in a membrane bioreactor treating industrial wastewater. *Environ Sci. Technol.* 36 (2002), pages 1102-1106. (Reemtsma et al., 2002).

Robinson, A. A., Belden, J. B. and Lydy, M. J.. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.*, **24** (2005), pages 423-430. (Robinson et al., 2005).

Rosenberger S et Kraume M; Filterability of activated sludge in membrane bioreactors. *Desalination*, 146 (2002), pages 373-379. (Rosenberger et Kraume, 2002).

Rosenberger S., Evenblij H., te Poele S., Wintgens T., Laabs C.. The importance of liquid phase analyses to understand fouling in membrane assisted activated sludge processes –six cases studies of different European research groups. *Journal of Membrane Science* 263 (2005) 113-126. (Rosenberger et al., 2005).

Rogenberger S., Laabs C., Lesjean B., Gnirss R., Amy G., Jekel M., Schrotter J.C.. Impact of colloidal and soluble performance in membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *Water Res.* 40 (2006) 710. (Rogenberger et al., 2006)

S

Sahinkaya Erkan, Dilek Filiz B.. Biodegradation of 4-Chlorophenol by acclimated and unacclimated activated sludge- Evaluation of biokinetic coefficients. *Environmental Research* 99 (2005), pages 243-252. (Sahinkaya et al., 2005).

Santos M.A., Pacheco M.. Mutagenicity of cyclophosphamide and kraft mill effluent and sediment on the eel *Anguilla Anguilla*. *L. Sci. Total Environ.* 171,(1995), pages 127-130. (Santos, Pacheco, 1995).

Schwarzenbach, R.P., Gschwend, P.M., Imboden, D.M., 2003. *Environmental Organic Chemistry*. Wiley, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.

Sheng G.P., Zhang M.L., Yu H.Q.. Characterization of adsorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from sludge. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* (2007). (Sheng, et al., 2007).

Simonich S.L., Federle T.W., Eckhoff W.S., Rottiers A., Webb S., Sabaliunas D., De Wolf W.. Removal of fragrance materials during US and European wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* 36, (2002), pages 2839–2847. (Simonich et al., 2002).

Sladek N.E.. Metabolism and pharmacokinetic behavior of cyclophosphamide and related oxazaphosphorines, in *Anticancer Drugs: Reactive Metabolism and Drug Interactions* (Powis G ed) (1994). pp 79–156, Pergamon Press, Oxford, UK. (Sladek, 1994).

Snyder, S.A., Adham, S., Redding, A.M., Cannon, F.S., DeCarolis, J., Oppenheimer, J., Wert, E.C., Yoon, Y., 2006. Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. *Desalinization*, in press. (Snyder et al, 2006).

Snyder, S.A., Leising, J., Westerhoff, P., Yoon, Y., Mash, H., Vanderford, B.J.. Biological attenuation of EDCs and PPCPs: implications for water reuse. *Ground Water Monit. Rem.* 24 (2004), pages 108–118. (Snyder et al., 2004).

Snyder, S.A., Westerhoff, P., Yoon, Y., Sedlak, D.. Pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disruptors in water: implications for the water industry. *Environ. Eng. Sci.* 20 (2003), pages 449–469. (Snyder et al., 2003).

Spark K.M., Swift R.S.. Effect of soil composition and dissolved organic matter on pesticide sorption. *Sci. Tot. Environ.* 298, (2002), pages 147–161. (Spark et Swift, 2002).

Spanjers H, Vanrolleghem PA, Olsson G, Dold PL. *Respirometry in control of the activated sludge process: principles*. IAWQ Scientific and Technical Report no. 7. London, UK: IAWQ Publishing; 1998. (Spanjers et al., 1998)

Steger-Hartmann T., Kümmerer K., Hartmann A.. Biological degradation of cyclophosphamide and its occurrence in sewage Water. *Ecotoxicology and environmental safety.* 36 (1997), pages 174-179. (Steger-Hartmann et al., 1997).

Stevens J.L., Northcott G.L., Stern G.A., Tomy G.T., Jones K.C.. PAHs, PCBs, PCNs, organochlorine pesticides, synthetic musks and polychlorinated n-alkanes in UK sewage sludge: survey results and implications. *Environ. Sci. Technol.* 37, (2003), pages 462–467. (Stevens et al., 2003).

Stewart P.S.. Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacterial Biofilms. *Int. J. Med. Microbiol.* 292 (2002), pages 107-113. (Stewart, 2002)

Stricot Marlène. *Bioréacteur à membrane à configuration externe: Influence de la configuration du procédé sur la structuration des matrices biologiques et le colmatage des membranes*. Thèse de doctorat, INSA Toulouse (2008).

Stuer-Lauridsen F., Birkved M., Hansen L.P., Holten-Lützhøft H.C., Halling-Sørensen B.. Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after therapeutic use. *Chemosphere* 40, (2000), pages 783–793. (Stuer-Lauridsen et al., 2000)

Stumpf M., Ternes T.A., Wilken R.D., Rodriguez S.V., Baumann W.. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *The Science of the Total Environment* 225 (1999), pages 135-141. (Stumpf et al., 1999).

T

Ternes T.A.. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32. (1998), pages 3245-3260. (Ternes, 1998)

Ternes T.A.. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Trends Anal. Chem.*, 20 (2001), pages 419-434. (Ternes, 2001).

Ternes T., Herrmann N., Bonerz M., Knacker T., Siegrist H., Joss A.. A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water research* 38 (2004), pages 4075-4084. (Ternes et al., 2004).

Ternes, T. A.; Joss, A. *Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances - The challenge of micropollutants in urban water management*. ed. ;IWA Publishing 2006, London, UK (Ternes and Joss, 2006).

Ternes, T.A., Meisenheimer, M., McDowell, D., Brauch, H.J., Brigitte, H.G., Preuss, G., William, U., Zulei-Seibert, N.. Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environ. Sci. Technol.* 36, (2002), pages 3855–3863. (Ternes et al., 2002).

Ternes, T.A., Stuber, J., Herrmann, N., McDowell, D., Ried, A., Kampmann, N., Teiser, B.. Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? *Water Res.* 37 (2003), pages 1976–1982. (Ternes et al., 2003).

Thanh B.X., Visvanathan C., Spérandio M., Ben Aim R.. Fouling characterization in aerobic granulation coupled baffled membrane separation unit. *Journal of Membrane Science* 318 (2008) 334–339 (Thanh et al., 2008).

Tixier, C.; Singer, H. P.; Oellers, S.; Müller, S. R., Occurrence and Fate of Carbamazepine, Clofibric Acid, Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, and Naproxen in Surface Waters. *Environ. Sci. Technol.* 37, (2003), pages 1061-1068. (Tixier et al., 2003).

Tomlinson, T. G.; Boon, A.; Trotman, C. N. A. Inhibition of nitrification in the activated sludge process of sewage disposal. *J. Appl. Bacteriol.* 29 (1966), page 266. (Tomlinson et al., 1966).

U

Urase, T., Kagawa, C., Kikuta, T.. Factors affecting removal of pharmaceutical substances and estrogens in membrane separation bioreactors. *Desalination* 178 (2005), pages 107-113. (Urase et al., 2005).

Urase, T.; Kikuta, T. Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. *Water Res.* 39, (2005), 1289. (Urase et Kikuta, 2005).

V

Van Kaam Romuald. Bioreacteur à membranes immergées pour le traitement d'eaux usées domestiques. Influence des conditions de filtration et de l'hydrodynamique sur les performances du pordédé. Thèse de Doctorat, INP Toulouse, (2005).

Vanrolleghem, P. A., Spanjers, H., Petersen, B., Ginestet, P., Takacs, I. Estimating (combinations of) activated sludge model No. 1 parameters and components by respirometry. *Water Science and Technology*. 39(1999)195-214. (Vanrolleghem et al., 1999).

Visvanathan C., Thu L.N., Jegatheesan V., Anotai J.. Biodegradation of pentachlorophenol in a membrane bioreactor. *Desalination* 183 (2005), pages 455-464. (Visvanathan et al., 2005).

Vocks M, Bracklow U, Drews A., Lesjean B, Mante Jan et Kraume M.. Comparison of polysaccharide concentration and fouling rates in different membrane activated sludge systems. *Desalination*, 199 (2006), 381-383. (Vocks et al., 2006).

W

Wang Xiao-mao and Waite T.D.. Retention of soluble microbial products in submerged membrane bioreactor. In: *Proceeding of the Membranes in Drinking Water Production and Wastewater Treatment congress*, Toulouse, France, PP. (2008). (Wang et Waite , 2008).

Wang X.M., Waite T.D.. Gel layer formation and hollow fibre membrane filterability of polysaccharides dispersions. *J. Memb. Sci.* 322 (2008b) 204 – 213. (Wang et Waite, 2008b).

Webb S., Ternes T., Gibert M., Olejniczak K.. Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water, *Toxicol. Letters*, 142, (2003), page 157-167. (Webb et al., 2003).

Weigel, S.; Kuhlmann, J.; Hühnerfuss, H., Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. *The Science of the Total Environment* 295,(2002), pages 131-141. (Weigel et al, 2002).

Weigel, S., U. Berger, E. Jensen, R. Kallenborn, H. Thoresen, and H. Hühnerfuss. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere*, 56, (2004), pages 583-592. (Weigel et al., 2004).

Weiss S. and Reemtsma T. Membrane bioreactors for municipal wastewater treatment – A viable option to reduce the amount of polar pollutants discharged into surface waters?. *Water research* 42, (2008), 3837–3847. (Weiss et Reemtsma, 2008).

Westerhoff, P., Yoon, Y., Snyder, S., Wert, E.. Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005), pages 6649–6663. (Westerhoff et al., 2005).

Wilén, B.M., Balmer P.. The effect of dissolved oxygen concentration on the structure, size and size distribution of activated sludge flocs. *Water Research*. (1999) Vol 33. No 2. Pages 391-400. (Wilén, Balmer, 1999).

Wilén B.M., Nielsen L.J., Keiding K., Nielsen P.H.. Influence of microbial activity on the stability of activated sludge flocs. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 18 (2000), pages 145-156. (Wilén B.M et al., 2000).

Wisniewski C., Grasmick A.. Floc size distribution in a membrane bioreactor and consequences for membrane fouling. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects* 138 (1998), pages 403-411. (Wisniewski et Grasmick, 1998).

Wisniewski C., Grasmick A. , Leon Cruz A.. Critical particle size in membrane bioreactors Case of a denitrifying bacterial suspension. *Journal of Membrane Science* 178 (2000) 141–150 (Wisniewski et al., 2000).

Witzig R., W. Manz, S. Rosenberger, U. Krüger, M. Kraume, U. Szewzyk. Microbiological aspects of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater. *Water Research*. Volume 36, Issue 2, January 2002, Pages 394-402 (Witzig et al. 2002).

X

Xing C.H, Tardieu E., Qiang Y., Wen Y.H. Ultrafiltration membrane bioreactor for urban wastewater reclamation. *Journal of Membrane Science*, 177 (2000), 73-82. (Xing et al., 2000).

Xing C.H, Qian Y., Wen X.H., Wu W.Z., Sun D.. Physical and biological characteristics of a tangential-flow MBR for municipal wastewater treatment. *Journal of Membrane Science* 191 (2001), pages 31-42. (Xing et al., 2001).

Y

Yoon, Y., Westerhoff, P., Snyder, S.A., Esparza, M.. HPLC fluorescence detection and adsorption of bisphenol A, 17 β -estradiol, and 17 α -ethynyl estradiol on powdered activated carbon. *Water Res.* 37 (2003), pages 3530–3537. (Yoon et al., 2003).

Yoon S.H. Important operational parameters of membrane bioreactor-sludge disintegration (MBR-SD) system for zero excess sludge production. *Water Research*, 37 (2003), 1921-1931. (Yoon S.H, 2003).

Z

Zhang J., Chua H.C., Zhou J., Fane A.G.. Factors affecting the membrane performance in submerged membrane bioreactors, *J. Membr. Sci.* 284 (2006) 54. (Zhang et al., 2006).

Zuccato E., Calamari D., Natangelo M. and Fanelli R.. Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* 355 (2000), pages 1789-1790. (Zuccato et al., 2000).

Zwiener, C., Frimmel, F.H.. Oxidative treatment of pharmaceuticals in water. *Water Res.* 34 (2000), pages 1881–1885. (Zwiener et Frimmel, 2000).

Zwiener, C., Seeger, G., Glauner, T., Frimmel, F.H.. Metabolites from biodegradation of pharmaceutical residues of ibuprofen in biofilm reactors and batch experiments. *Anal. Bioanal. Chem.* 372, (2002) pages 569-575. (Zwiener et al., 2002).

Annexes

Annexe 1. Fiche technique-Viandox®



Fiche Technique



VIANDOX bouteille de 830 g

Dénomination de vente:

Assaisonnement

Liste d'Ingrédients (par ordre décroissant):

Eau, sel, extrait de levure, colorant: caramel (E150c), sauce soja, exhausteurs de goût: glutamate monosodique, inosinate disodique, guanylate disodique, acidifiants: acide citrique et acide lactique, extrait de viande, arôme (dont céleri).

Liste des Ingrédients allergènes selon la Directive Européenne(2003/89/CE):

Liste	Présence dans la formule	Contamination croisée	Nature
Céréales contenant du gluten (blé, seigle, orge, avoine, épeautre, kamut et leurs souches hybridées) et produits à base de ces céréales			
Crustacés et produits à base de crustacés			
Oeufs et produits à base d'oeufs			
Poissons et produits à base de poissons			
Arachide et produits à base d'arachide			
Soja et produits à base de soja	X		sauce soja
Lait et produits à base de lait			
Fruits à coques (amandes, noisettes, noix de Cajou, noix de Pécan, noix du Brésil, pistaches, noix de Macadamia, noix de Quennesland) et dérivés			
Céleri et produits à base de céleri	X		arôme
Moutarde et produits à base de moutarde			
Graines de sésame et produits à bases de graines de sésame			
Anhydride sulfureux et Sulfites en concentration de plus de 10mg/kg ou 10mg/l de SO2			

Valeurs nutritionnelles:

	Valeur nutritionnelle moyenne pour 100g de produit
Valeurs énergétiques	36 kcal / 150 KJ
Protéines	5 g
Glucides	1 g
Lipides	3 g

Convient aux végétariens (pas de viande ou poisson): non

Convient aux végétaliens (pas de produits animaux, de poisson, viande ou poisson): non

Caractéristiques Micro-biologiques:

	Limite Maximale (M)	Unité
Flores Totales 30°C	< 10 000	germes/ g
Entérobactéries	<100	germes/ g
E.Coli	<1	germes/ g
Levures	<10	germes/ g
Moisissures	<10	germes/ g
Salmonelles	absence	germes/ 25g
Staphylocoques aureus	<100	germes/ g

Caractéristiques Physico-Chimiques:

% Eau (moyenne):	~84
% Humidité:	~1,19
pH (moyenne):	~4,1

Conservation:

DLUO Garantie Client distributeur:	4 mois
Mode de conservation:	
avant ouverture:	à température ambiante <25°C
après ouverture:	au réfrigérateur.

Gencod UC:

3034450001024

Fournisseur:

Unilever France Foodsolutions
23, rue François Jacob
92 842 Rueil-Malmaison

Qualité:

Norme ISO 9001 version 2000
HACCP en place

N° Agrément CEE:

Produit ne nécessitant pas d'agrément sanitaire

Annexe 2. Techniques analytiques mises en œuvre

2.1 Analyses des MES

On prélève 50 mL de boue. Les 50 mL sont ensuite répartis dans deux fioles jaugées de 25 mL puis versés dans deux godets, centrifugés pendant 20 minutes à une vitesse de 5000 tour/min. En fin d'opération, on élimine le surnageant et on récupère soigneusement les deux culots de boue qu'on laisse sécher par le biais d'un analyseur d'humidité Precisa HA60 jusqu'à atteindre une masse constante. Les résultats sont exprimés en (g.L⁻¹), obtenue en divisant le poids sec acquis avec l'analyseur d'humidité par le volume d'échantillon analysé. Cette mesure est faite deux fois par semaine.

2.2 Mesure de la Demande Chimique en Oxygène (DCO)

Tableau 2.2 résume le protocole expérimental DCO

Demande Chimique en Oxygène (DCO)
<i>Préparation du blanc : 2mL d'eau distillée dans un tube du kit contenant les réactifs</i>
<i>Préparation de l'échantillon à doser : Ajouter 2 ml de l'échantillon dans un tube du kit contenant les réactifs</i>
<i>Retourner (tourner de haut en bas, attendre que toute la solution descende, pause, retourner le tube et attendre que toute la solution descende) les tubes plusieurs fois.</i>
<i>Pendant l'agitation, les tubes deviennent très chauds</i>
<i>Les tubes sont ensuite chauffés à 150°C pendant 2 heures (réacteur DCO spécifique, Hach)</i>
<i>Eteindre le réacteur DCO et laisser refroidir les tubes pendant 20 minutes (ne pas retirer les tubes du réacteur DCO)</i>
<i>Sortir les tubes du réacteur DCO, retourner plusieurs fois les tubes et laisse- les refroidir jusqu'à atteindre la température ambiante</i>
<i>Faire le blanc avec le tube réactif préparé à l'avance avec 2 mL d'eau distillée.</i>
<i>Lire l'absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde de 620 nm. Le résultat est exprimé en mg d'oxygène par litre</i>

2.3 Dosage des protéines et substances humiques

Tableau 2.3. Protocole de dosage des Protéines et des substances humiques

Protéines et substances humiques	
Préparation des réactifs	
(A) 2 g de Na_2CO_3 + 0,4 g de NaOH dans 100 ml d'eau distillée.	
(B) 25 mg de CuSO_4 et 50 mg de $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6, 4\text{H}_2\text{O}$ (Tartrate de potassium et de sodium) dans 5 ml d'eau distillée.	
(C) 5 ml Réactif de Folin-Ciocalciu + 5 ml d'eau distillée.	
(D) 50 mg de $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6, 4\text{H}_2\text{O}$ (Tartrate de potassium et de sodium) dans 5 ml d'eau distillée.	
Réactif I : 50 ml (A) + 5 ml (B)	
Réactif II : 50 ml (A) + 5 ml (D)	
En présence de CuSO_4	En absence de CuSO_4
2 mL de réactif I	2 mL de réactif II
0,5 mL échantillon	0,5 mL échantillon
Homogénéisation au vortex	Homogénéisation au vortex
0,2 ml de (C)	0,2 ml de (C)
Homogénéisation au vortex	Homogénéisation au vortex
Repos 30 min à l'obscurité	Repos 30 min à l'obscurité
Lecture à 691 nm contre un blanc réactif (eau distillée)	Lecture à 691 nm contre un blanc réactif (eau distillée)

2.4 Dosage des polysaccharides

Tableau 2.4. Protocole de dosage des polysaccharides

Polysaccharides
<i>Préparation du réactif d'anthrone: On dissout à froid 400 mg d'anthrone (Acros) dans 200 ml de H₂SO₄ concentré (98%).</i>
<i>On ajoute dans un tube plongé dans un bain de glace, 2 ml de réactif d'anthrone, puis 1 ml d'échantillon à analyser</i>
<i>Homogénéiser (vortex) et boucher les tubes avec des billes de verre. Garder les tubes au froid.</i>
<i>Les tubes sont ensuite portés dans un bain-marie (Mettler) à 95°C pendant 5 minutes, on refroidit rapidement dans la glace.</i>
<i>Homogénéiser (vortex).</i>
<i>Refroidir à 20°C</i>
<i>On homogénéise et on lit l'absorbance au spectrophotomètre dans des cuves de 1 cm de trajet optique à 625 nm.</i>

2.5. Microscope confocal

Le protocole :

- Solution A : 1.67 mM SYTO 9 + 1,67 mM IP
- Solution B : 1.67 mM SYTO 9 + 18 mM IP
- Solution C: mélange vol/vol des solutions A et B
- 3µL solution C + 1 mL de suspension microbienne
- Incubation 15 minutes à température ambiante à l'obscurité
- Visualisation microscopique confocale.

2.6 Détection et quantification du Cyclophosphamide (CP) et 4-Keto CP.

Tableau 2.5.8.1 Protocole de Détection et quantification du CP, et du 4-Keto CP.

Dosage du Cyclophosphamide (CP) et du 4-Keto CP
<i>Échantillon (Mesure du volume de l'échantillon, environ 150 mL)</i>
<i>Ajout d'ifosfamide (IF=talon interne, 20 µL d'ifosfamide à 0,01 mg/mL).</i>
<i>Lyophilisation de l'échantillon</i>
<i>Extraction au dichlorométhane</i>
<i>20ml de dichlorométhane, vortex pendant 1 min, puis agitation pendant 30 min.</i>
<i>Deux fois la même procédure avec 5ml de dichlorométhane.</i>
<i>Evaporation à Sec</i>
<i>Reprise par 100 µL de phase mobile</i>
<i>Analyse par HPLC-MS-MS</i>
<i>(IF, Cyclophosphamide (CP), 4-Keto CP)</i>

Annexe 3. Test pour l'évaluation du pouvoir colmatant d'une boue ou d'un surnageant. Pressurisation à l'eau ou à l'air ?

Dans le chapitre II nous décrivons le système permettant d'évaluer le pouvoir colmatant de la boue ou du surnageant. Lors de ce test, la filtration est de type frontale, se fait sans agitation et à pression constante. La pressurisation du système peut se faire soit avec de l'air, soit avec de l'eau distillée. Afin de déterminer l'influence de ses deux moyens de pressurisation, nous avons prélevé un échantillon de boue activée de la station de Brax et évalué la pente de T/V en fonction de V après une filtration avec de l'air et avec de l'eau à une pression constante de 0.5 bars. La concentration en MES de l'échantillon est de 6 g/L. La figure A3.1 montre l'évolution du volume filtré en fonction du temps.

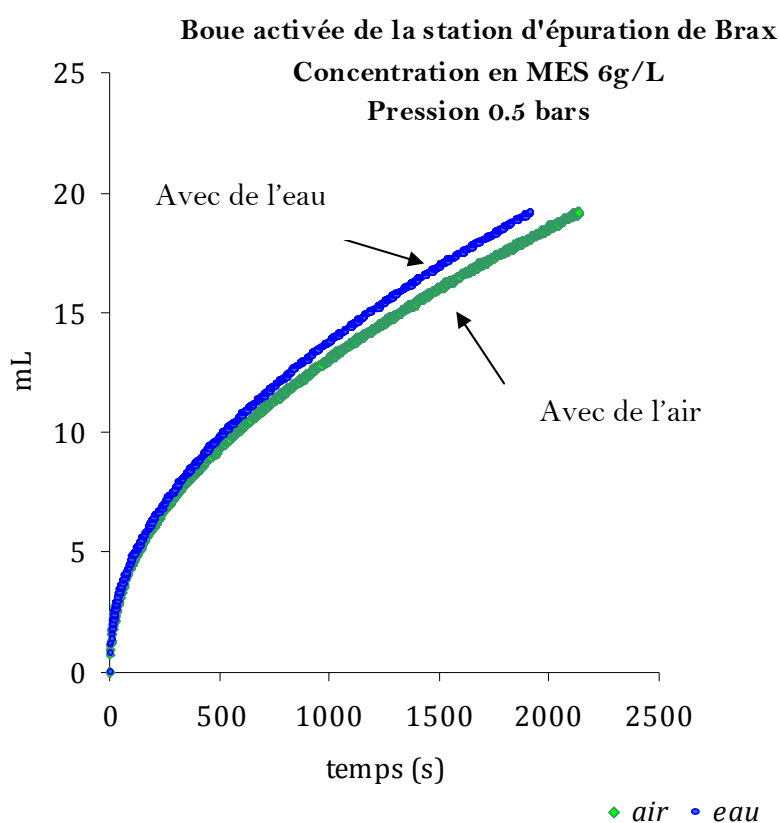


Figure A3.1 Evolution du volume filtré en fonction du temps.

En suivant l'évolution de la filtration à travers la représentation t/V en fonction de V (figure A3.2) on pourra faire une régression linéaire des données et obtenir la pente de la droite qui nous conduira au produit $\alpha.C$.

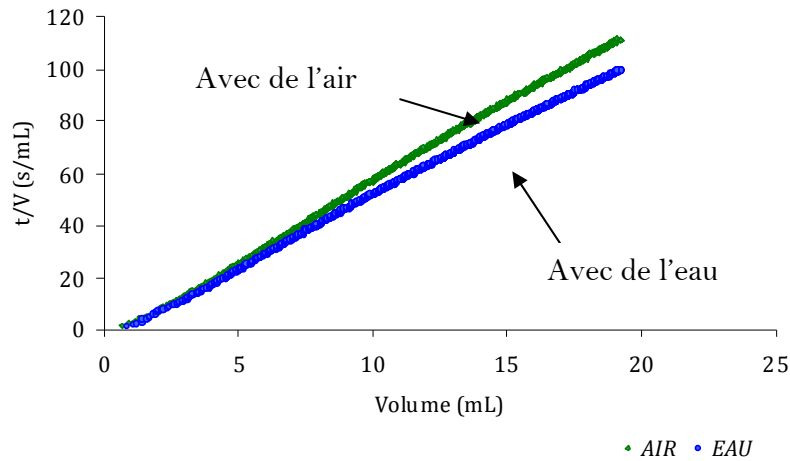


Figure A3.2 Evolution de la filtration à travers la représentation t/V en fonction de V

Les valeurs des pentes sont ensuite calculées, comme il est montré sur la figure A3.3.

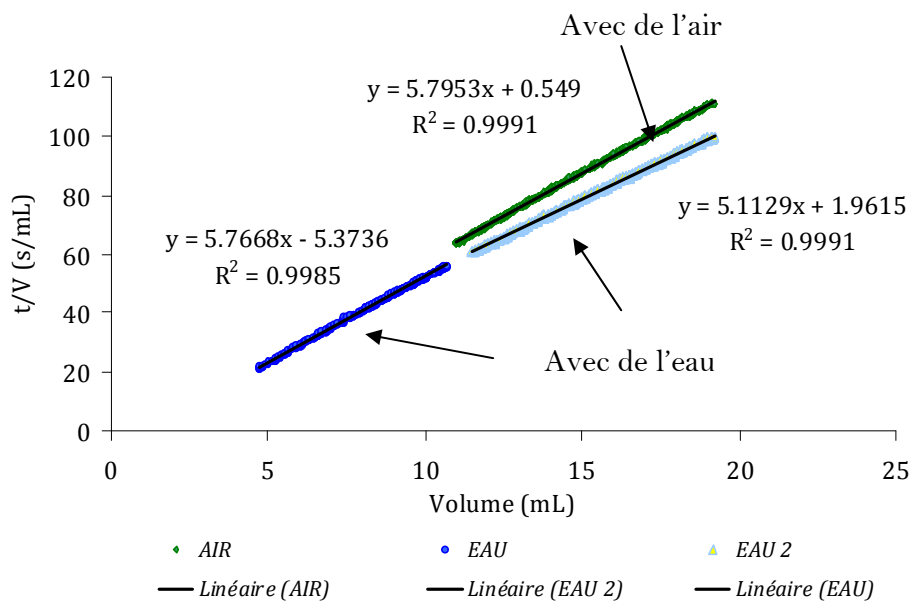


Figure A3.3 Les valeurs des pentes pour les deux filtrations réalisées.

Un écart d'environ 12% est observé entre la pente final de l'échantillon pressurisé avec de l'air et celui pressurisé avec de l'eau distillée. Nous remarquons aussi un changement de pente lors de la filtration avec de l'eau. Ceci peut être expliqué par un effet de dilution sur l'échantillon de la boue activée créée par l'eau distillée utilisée pour la pressurisation du système. En outre, la valeur de la pente initiale de la filtration avec de l'eau est très similaire à celle de la pente finale de l'échantillon pressurisé avec de l'air. Afin d'éviter les effets de dilution, nous avons décidé d'utiliser l'air comme moyen de pressurisation.

Annexe 4. Les substances humiques

Le terme **substance humique** est un nom générique donné à un grand nombre de polymères organiques amorphes et colloïdaux provenant de la dégradation et de la transformation d'éléments végétaux. Des substances humiques se trouvent dans tous les sols et dans toutes les eaux. Leur variabilité de structure est induite par l'origine et la nature du matériel humique ou par les conditions environnementales (Eyheraguibel, 2004). Les acides humiques sont structurellement de larges complexes macromoléculaires ayant une apparence brune-noire en solution de pH supérieur à 2, ils sont généralement hétérogènes et sont principalement constitués de carbone, d'oxygène, d'hydrogène, d'azote et occasionnellement de soufre et de phosphore.

La structure des substances humiques reste jusqu'à présent mal définie et il est difficile de la représenter par une formule moléculaire. Les connaissances actuelles se limitent à des études comportementales, à des hypothèses de structure de ces macromolécules (modélisation, mise évidence de fragments) mais la biochimie de formation de ces composés reste l'un des aspects les moins connus. L'analyse des structures humiques a permis de mettre en évidence une série de groupements présents dans les différentes molécules humiques. Plusieurs modèles ont été proposés ne présentant en générale que des séquences de structure humique. Globalement, ces structures peuvent être décrites comme des assemblages de résidus aromatiques et aliphatiques portant des groupes carboxyliques(COOH), phénoliques et alcoxylés(OH),. L'existence des groupes hydroquinones et semi-quinones, des cétones et des groupements amines dans la structure des substances humiques a été également signalée (Eyheraguibel, 2004).

La nature acide des groupes fonctionnels confère aux SH un caractère poly-électrolytique de type anionique dont résultent leurs propriétés complexantes vis-à-vis des ions métalliques. Le pH et la concentration des molécules influencent la structure des substances humiques (Schnitzer, 1978).

Parmi ces modèles, le modèle de Stevenson (1982) qui est généralement la plus citée et permet de donner une idée de la complexité structurale de ce type de molécule, représente les acides humiques comme des macromolécules aromatiques complexes (figure A.4.9). Les groupes aromatiques sont substitués par des composés aliphatiques et la liaison de peptides et de sucres aminés explique la présence de l'azote dans ces structures.

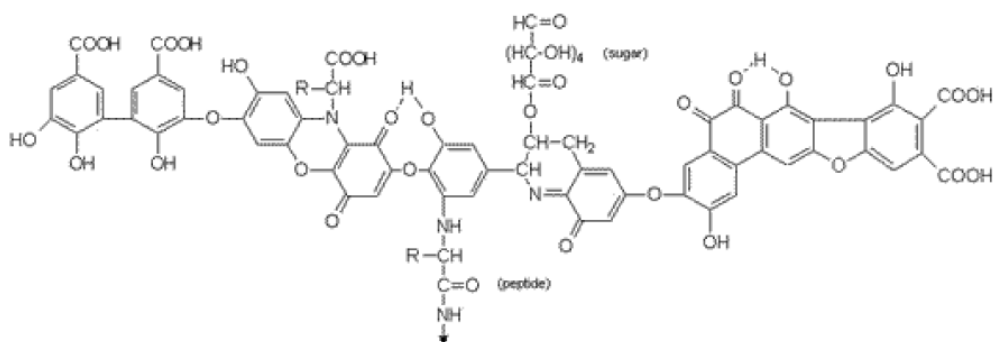
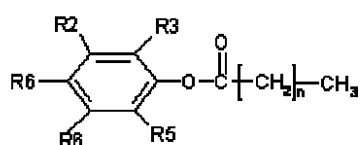


Figure A.4.9 - Modèle d'un acide humique

Le modèle de Schnitzer (1978) présente un motif structural élémentaire constitué d'un monomère aromatique substitué par différents radicaux (figure A.4.10).



R1 : COOH, COCH₃ ou OH
 R2 : H, OH ou COOH
 R3 : H, OH, OCH₃ ou COOH
 R5 : H, OH ou OCH₃
 R6 : H ou COOCH₃

n compris entre 10 et 15

Figure A.4.10- Monomère constitutif des substances humiques (d'après Schnitzer, 1972)

Il est également présenté la structure d'un modèle d'acide humique basée sur des études de pyrolyse, proposée par Schulten et Schnitzer (1993).

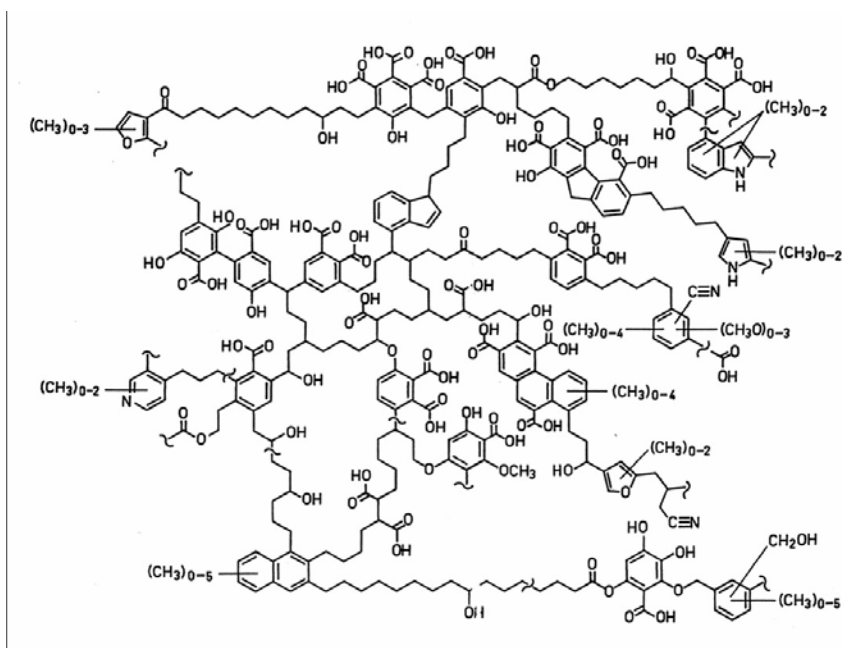


Figure A.4.11 Structure d'un modèle d'acide humique selon Schnitzer et Schulten (1993).

Références bibliographiques

Eyheraguibel Boris. Caractérisation des substances humiques biomimétiques –effets sur les végétaux. Thèse de Doctorat. INP toulouse. (2004).

Stevenson, F. J. (1982). Humus Chemistry. New York, Wiley.

Schnitzer, M. and S. U. Khan (1972). Humic substances in the Environment. Newyork, Marcel Dekker.

Schnitzer, M. and S. U. Khan (1978). Soil organic matter. New York, Elsevier Scientific Publ.

H.R. Schulten, M. Schnitzer, Naturwissenschaften, 80, (1993) 29.

Annexe 5. Respirométrie

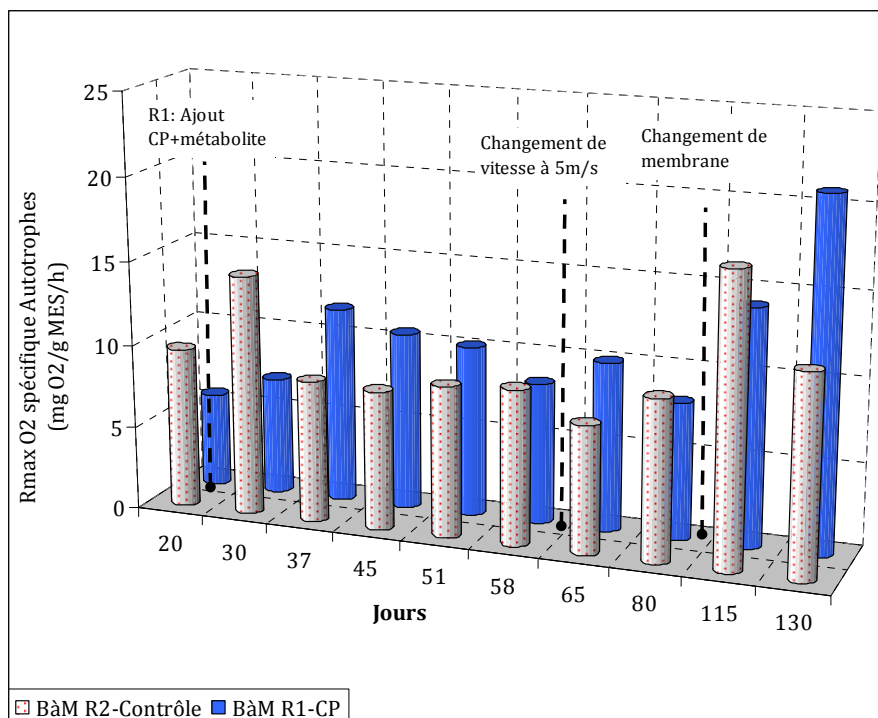


Figure A5.1 Evolution de la respiration exogène maximale spécifique des micro-organismes autotrophes en fonction du temps pour les deux bioréacteurs. Campagne expérimentale I. (Âge de Boues 50 jours).

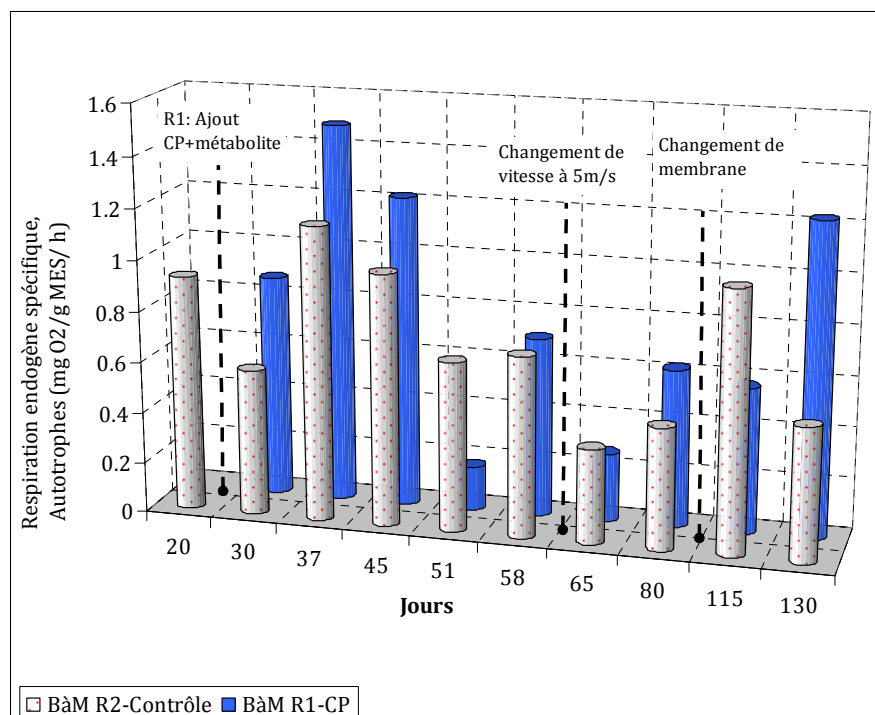


Figure A5.2 Evolution de la respiration endogène spécifique des micro-organismes autotrophes en fonction du temps pour les deux bioréacteurs. Campagne expérimentale I. (Âge de Boues 50 jours).

Annexe 6

Study of extracellular polymeric substances and membrane bioreactor fouling in the treatment of municipal wastewater containing cytostatic drug.

Avella A.C.¹, Delgado L.F.², Görner T.¹, Albasi C.², Galmiche M.¹, de Donato Ph¹.

¹ Laboratoire Environnement et Minéralurgie, Nancy-Université, CNRS, 15 avenue du Charmois, 54500 Vandoeuvre les Nancy, France.

² Laboratoire de Génie Chimique, UMR CNRS 5503, 5 rue de Paulin Talabot, 31106 Toulouse, France.

Corresponding author: Tel: +33-383596266. FAX: +33-383596285.

Email: catalina.avella@ensg.inpl-nancy.fr

Abstract

The presence of the anticancer drug cyclophosphamide (CPs) in municipal wastewater raises several environmental problems. Membrane bioreactors (MBR) were investigated in order to improve the elimination of such molecules. The functioning of two lab scale MBR was followed in parallel (one with the cytostatic drug, the second without drug). Chromatographic and spectroscopic studies (UV-Vis and IR) showed that the presence of CPs and its metabolites induced in the biological sludge increased concentrations especially of soluble exopolymeric substances (EPS) (mainly polysaccharides and in a lesser extent proteins). Size exclusion chromatography analysis revealed that in the presence of CPs, high molecular EPS were formed (polysaccharides corresponding to about 6 kDa and proteins to about 18 kDa). The retention by the membrane of these high molecular EPS contributed to a large extent to the membrane fouling.

Key words: extracellular polymeric substances, membrane fouling, size exclusion chromatography, infrared spectroscopy, UV-Vis spectroscopy, proteins and polysaccharides.

1. Introduction

The consuming of organic pollutants by biomass during biological wastewater treatment is accompanied by production of extracellular polymeric substances (EPS) issued from microbial metabolism and from cell autolysis. The EPS are a main sludge component keeping the bacterial floc together in a three dimensional matrix (Wingender et al., 1999, Nielsen and Jahn, 1999). The EPS contain polysaccharides and proteins accounting up to 75-90 %, lipids, small amounts of DNA and RNA. The EPS with their very heterogeneous nature form a complex polymeric network with a vast surface area capable of adsorbing pollutants, nutrients and minerals (Finlayson et al., 1998). They can be present as pure or mixed components with various functional groups and their molecular masses range from a few hundreds to a several hundreds thousands Da (Garnier et al., 2005). The EPS covering a cell surface can be considered as a polyelectrolyte adsorbed onto a colloidal particle, creating suitable conditions for bacterial attachment. Thus the EPS are involved in many adhesion processes such as bacterial cells aggregation and adhesion of biofilm onto solid surface by electrostatic or by polymeric interactions (Tsuneda et al., 2003).

The EPS play also an important role on several stages of wastewater treatment process: from sludge flocculation and sludge settling, up to sludge dewatering operation before handling or its ultimate disposal. Their role in the sludge was often studied (see a critical review of Liu Yan and Fang Herbert H.P., 2003, compiling about 180 references), however it is not yet clearly established and studies are sometimes controversial.

Many toxic substances issued from medical treatments or from industrial activity (heavy metals and different chemical toxins) are present in municipal wastewaters. The most significant impacts of toxic compounds to the biological treatment process include loss of chemical oxygen demand (COD) removal efficiency, inhibition of nitrification and deflocculation with corresponding loss of biomass (Love et al., 2000). The increasing use

of anticancer drugs and their presence (or their metabolites) in wastewater is a relatively new problem and few studies exist about the behaviour of the sludge exposed to pharmaceutical molecules. The biological degradation in municipal wastewater treatment contributes only to a limited extent to the overall load reduction of different pharmaceutical families (Joss et al., 2006). Membrane reactors (a combination of membrane and activated sludge process) showed in some cases (Bernhard M et al., 2006; Quintana et al., 2005) a significantly better removal of persistent pharmaceuticals. They achieve a higher effluent quality than by a conventional activated sludge process, offering potential advantages such as complete removal of solids from effluent, superior nutrient and organic removal, high loading rate capabilities and small land requirements (Stephenson et al., 2000). A main problem in membrane application is a rapid decline of permeation flux due to the membrane fouling which requires a frequent membrane cleaning /replacement increasing thus the operation costs.

The EPS were identified as one of the most significant biological factors responsible for membrane fouling (Chang et al., 2002, Drews et al., 2006, Janga et al., 2007, Lyko et al., 2007) and for membrane deterioration (Meng and Yang, 2007, Tansel B. et al., 2006; Lee W-N. et al., 2007). Atomic force microscopy showed that membranes were covered by bacteria cells and biopolymers deposited as modular units firmly attached to the membrane surface and to each other (Tansel et al., 2006). The soluble EPS in sludge supernatant seem to contribute significantly to the total specific cake resistance (Nuengjamnong Ch. et al., 2005, Rosenberger et al., 2006, Bae and Tank, 2005). In some cases, cake resistance was found to be strongly related to protein content in supernatant (Hernandez Rojas et al., 2005, Meng et al., 2006), while in other studies, to polysaccharides (Drews et al., 2006). Al-Halbouni et al. (2007) observed that membrane fouling by high molecular weight polysaccharides and proteins and excess EPS production

occurred at low sludge retention time in pilot reactor or during seasonal variations in full scale reactor.

Delgado et al. (2008) studied the application of membrane bioreactor technology (MBR) for removal of cytostatic drug used in cancer chemotherapy. It was found that under steady state conditions, the drug removal remained quite stable (75-80 %) and COD and total nitrogen removal efficiency were not altered by anticancer drug toxicity. However it induced a modification of biological suspended solids and more frequent membrane fouling problems than in control reactor without drug.

The aim of this study is a better understanding of biomass behaviour in mixed liquor of membrane bioreactor when treating wastewater containing anticancer drug. We followed the biomass activity, via EPS production, in a lab scale membrane bioreactor in presence of cyclophosphamide and its metabolites (called later CPs) and compared it with a control reactor without CPs. The results presented here were obtained with reactors running under steady state conditions during four weeks (at the end of 160 days of total running time). The EPS production was examined by global methods such as total proteins and polysaccharides analysis and more deeply investigated by size exclusion chromatography for molecular size information and by infrared spectroscopy to identify the chemical species.

2. Materials and methods.

2.1. Reactors and operating conditions

The study presented here was performed over a period of four weeks on two identical lab-scale crossflow membrane bioreactors run in parallel (each reactor with 20 L of working volume). This period represent a steady-state, whereas the total reactors operation time was

carried out during 160 days. Thus, the hydraulic retention time (HRT) was 48h and the sludge retention time (SRT) was around 50 days. This leads to a low food to microorganisms ratio (F/M) which was 0.14 COD/kg MLSS.d in reactor with anticancer drug R1 and 0.11 COD/Kg MLSS.d in a control reactor R2 (MLSS: mixed liquor suspended solids were measured according to the analytical methods described in the standard methods 2540 G (APHA et al., 1998). The recirculation velocity of retentate was 5m/s.

COD concentrations, transmembrane pressure (TMP), pH-values and temperature were monitored. The membrane modules used were ceramic tubular Membralox® (MF) with 0.0055 m² of surface area and pore size 0.2 µm (Pall Exekia, France).

The Cyclophosphamide (5µg/L) and its main metabolites (Acrolein 2.25 µg/L, Phosphoramidate Mustard 8.88 µg/L, 4-ketocyclophosphamide 0.58 µg/L, Nitrogen Mustard 0.517 µg/L) were continuously added to reactor R1, whereas the second R2 served as a control.

Molecules provider: NIOMECH, part of IIT GmbH (university of Bielefeld, universitätsstr. 25 DE-33615 BIELEFELD) : D-18845 - 4-keto-cyclophosphamide ; D-18846 - phosphoramidate mustard ; D-19990 - nitrogen mustard hydrochlorid and SIGMA (St Quentin Fallavier, France) 01680 Acroléine ; C0768 Cyclophosphamide.

Each reactor was inoculated with activated sludge from a municipal sewage treatment plant (total solids 3g/L). Raw water (Inlet COD 2300 mg/L, Organic loading rate 1.1 Kg COD/(m³ day)) was composed of domestic water (9.75 L/day) and Viandox ® (0.25 L/day), identical for both reactors.

2.2. EPS analysis

2.2.1. Sampling and samples preparation

Three kinds of samples were analysed: *i)* the supernatant of the mixed liquor *ii)* the membrane permeate and *iii)* the sludge biomass (settled pellets). The sampled reactor liquor, was centrifuged (20 min 4200g) to separate the biomass (settled pellets) from the supernatant. The soluble matter present in the supernatants (S) and in the permeates (P) were directly analysed by methods described later. The EPS bound in centrifuged sludge were extracted by the Dowex method (Frolund et al., 1996) before further analysis; these samples will be called B. The samples from reactor R1 and R2, were analysed at the beginning of steady state and then, after two, three and four weeks of reactors running.

2.2.2. Total protein (PR) and polysaccharides (PS) analysis.

For a total protein (PR) and polysaccharides (PS) content, the classical UV-Vis methods were applied. Proteins determination was done by the total proteins kit micro Lowry®, Peterson's modification (Sigma-Aldrich, France) using bovine serum albumin as a standard for calibration from 20 to 200 mg/L, absorbance was measured at 750 nm. Polysaccharides were determined according to the classical Dubois protocol (Dubois et al., 1956) at 485 nm, calibration was done with glucose in the concentrations from 10 to 100 mg/L. All samples were measured in duplicate and diluted prior to the experiment if necessary.

2.2.3. High pressure size exclusion chromatography

The EPS were analysed by high pressure size exclusion chromatography (HPSEC) to estimate a molecular size of present molecules (Görner et al., 2003; Garnier et al., 2005).

One chromatographic peak obtained by size exclusion chromatography can correspond to different pure molecules having the same hydrodynamic diameter d_h , or association of several molecules. Moreover, the d_h depends also on the apparent size of the molecule in a given mobile phase, whether the molecule is in an unfolded form or not. Therefore the calibration with commercially available pure PR and PS gives only information about apparent molecular size.

The separation of EPS samples was carried out with a Hewlett Packard 1100 series chromatograph. A Zorbax Bio series column (GF-250, 25cm x 9.4mm, Agilent Technologies, France) thermostated at 25°C was used. The mobile phase (flow rate 1 ml/min) was 0.2M NaCl. The detection was carried out at 25°C with a diode array UV detector (HP 1100 series) at 215nm. All samples were filtered with 0.2 μ m (chromafil®) filters prior to injection. The column was calibrated by standard polysaccharides (180, 738, 3700, 5900, 11800, 22800, 47300, 112000, 212000, 404000, 788000 Da; Polymers Laboratories, France) and standard proteins (bovine insulin 5730 Da, chicken albumin 44300 Da, bovine serum albumin 66000 Da; β -amylase 200000 Da, thyroglobulin 670000 Da; Sigma-Aldrich, France).

2.2.4. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Spectral analysis was performed on FT-IR spectrometer (Bruker IFS 55 with DTGS detector). All measurements were made in transmission mode in the 4000-600 cm^{-1} range (64 points scans, resolution $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$). Each sample was deposited 3x100 μ l in the center of a ZnSe slide, the material was dried under low vacuum until was formed a solid film. The diameter of the IR spot was 5mm. The spectra were treated using OPUS software.

3. Results and discussion

3.1. Mixed liquor suspended solids (MLSS) and total protein and polysaccharides analysis.

The MLSS was taken as a parameter to assess the biomass evolution. In control reactor R2, the MLSS content increased progressively during the four weeks running (figure 1), while in CPs presence (R1), MLSS remained constant. This indicates that conditions in the control reactor allowed an increase of biomass population, but not in CPs presence.

Study of bioreactor liqueur supernatants. The analysis of total protein (PR) and total polysaccharides (PS) content in the reactor liqueur supernatants showed that the concentration of these two main EPS components was higher in reactor with CPs. To comply with MLSS evolution, all PR and PS values were normalized per g of MLSS. Thus the normalized values are presented in the form of histograms in figure 2: it can be seen that in presence of CPs (figure 2a) the normalized concentrations of PR and PS were found significantly higher than in control reactor (figure 2b). In control reactor, the normalized PR and PS concentrations remained rather constant. So it seems that it was CPs presence which induced the increase of soluble EPS.

Study of permeates. Both permeates were also systematically analysed for PR and PS content. Figure 2 (2c and 2d) shows that both permeates had the same normalized concentrations of PR and PS (indicating a good membrane performance of retention). However the frequent R1 membrane fouling led us to evaluate the total amount of PR and PS retained by membranes during the four weeks experiment.

Total amount of proteins and polysaccharides (Δm_i) retained by membranes. These values were calculated from the differences of PR or PS concentrations Δc_i of solutions before and after membrane filtration taking into account the filtrated volumes V_i in each reactor during four weeks experiment ($\Delta m_i = \Delta c_i \cdot V_i$). The filtrated volume was identical for both reactors. It can be observed (figure 3a and 3b) that the amount of PR and PS (and their sum PR + PS considered as majority components of EPS) retained by membrane of R1 reactor at each filtration stage was systematically higher than that retained by membrane of the control reactor. This contributed to a more frequent R1 membrane fouling when comparing with a control reactor.

3.2. High pressure size exclusion chromatography study

The analysis by HPSEC was undertaken to have more information about the EPS present in both reactors. Three types of samples were followed: the supernatants (S), the permeates (P) directly injected on the column and the bound EPS (B) extracted from the sludge. To see the influence of CPs on the EPS production by biomass, the chromatograms were normalized per gram of biomass (assimilated to MLSS values as mentioned above) present in reactors R1 and R2 respectively at each sampling. The surface of peaks can be in approximation considered as a representative of EPS concentration. This simplified approach (supposing all species having the same detector answer) is unavoidable because of the outstanding complexity of EPS containing various polysaccharides and proteins, with different chain length and moreover which are involved in molecule associations (Garnier et al., 2005).

The main effect of the CPs presence on biomass during the experiment duration is obvious on figure 4: A significantly increased concentration of large macromolecular sizes of soluble EPS can be observed in the supernatant of R1 reactor (figure 4a), while in control reactor R2 it remained constant. The same phenomenon was observed also in the case of EPS bound in the sludge, but in a less extent (figure 4c and 4f). The EPS molecules have a wide range of molecular sizes with no predominant size family therefore only one large peak is observed with maximum at the elution volume V_e about 12 mL, accompanied by a very small peak with very large molecular size compounds (V_e about 7 mL). The maximum of the main increasing peak would correspond to the 18000 Da for PR and to 6000 Da for PS. The presence of a lonely peak in the supernatant for the 23 days sampling is considered as an accident (observed also in corresponding permeate figure 4b). The small peak with V_e about 7 mL corresponding to very large molecular species (PR of 670000 Da and PS of 404000 Da) was present in both reactors; it means that these species were not influenced by CPs presence.

The chromatographic profiles of permeates (figure 4b and 4e) are much more simple than that of the corresponding supernatants (figure 4a and 4d), large molecular sizes are missing in permeates. The same chromatographic profiles were obtained in presence and in absence of CPs. According to the column calibration, only molecules smaller than 900 Da for proteins and smaller than about 700 Da for polysaccharides were present in permeates issued from both reactors. This demonstrates clearly that the membrane filtration eliminated successfully large size species which represent an important part of the soluble macromolecules.

Both methods (global UV-Vis methods and HPSEC) showed an efficient membrane filtration of both supernatants. In figure 5 are reported the normalized chromatograms area

of EPS present in the supernatants, the normalized total PS and PR concentrations as function of the reactor running time. It can be clearly seen that while in the control reactor all variables remained rather constant, in reactor R1 the chromatographic areas and proteins and polysaccharides concentrations increased with the time.

This observation inspires some remarks: The EPS production is the result of microbial activity (soluble part is currently named soluble microbial products (SMP) in devoted papers (Le-Clech et al., 2006). The increasing of EPS chromatogram area shows that the EPS concentration increased significantly in CPs presence. This could be a result of increased production by the same number of micro organisms, or due to the increased microbial population with a constant EPS production, or by both mechanisms. We have seen previously that the MLSS values remained constant in reactor with CPs and a slight rise was observed in the control reactor. So the microbial biomass in R1 can be considered as stabilized, however to comply with some MLSS variation, all here considered parameters (chromatogram area, PR and PS total concentrations) were normalized to respective MLSS values. Thus the increased EPS concentrations can be attributed only to the more intense PR and PS production as a protection reaction. (Do bacteria produce more EPS to protect cells from harsh external environment ?).

This result is in full agreement with other studies (Henriques and Love, 2007) where the EPS matrix was found as a protective barrier for bacteria inside sludge flocs exposed to chemicals toxins (such as octanol and cadmium). The presence of chromium increased the presence of soluble EPS and EPS accumulation, some of them released as a result of cell lysis (Aquino and Stuckey, 2004). The general trend of increased membrane fouling under unsteady state reactor conditions (Drews et al., 2006) was attributed to the stress situation for a biomass emitting special polysaccharides with inherent fouling potential. It was also reported (Everst, 2006) that in a biofilm, bacteria are a thousand times more resistant to

antibiotics than in liquid suspension. It has been known since the seventies that bacteria “communicate”, secreting peptides and proteins for organizing the group survival. It can be mentioned the example of *Saphylococcus aureus* where the host invasion was accompanied by an important production of proteins favouring the bacteria attachment and thus colonisation and infection (Everst, 2006). It seems that in our case we are in a similar situation, the presence of CPs toxics stimulated the survival mechanisms and the EPS production with a slightly higher proportion of polysaccharides over proteins. A more detailed examination of produced EPS substances was performed by FTIR spectroscopy .

3.3. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

In order to obtain chemical information about the EPS present in supernatants (S), permeates (P) and bound EPS (B) of R1 and R2, samples were submitted to FTIR analysis. Using such a technique, the different constituents in a sample can be identified from their specific infrared profiles. Furthermore, bands intensity can be related to the amount of compounds. In the case of polysaccharides, linear relationships were obtained between band intensity and concentration (Marcotte L. et al., 2007).

The most representative samples (according to HPSEC results, figure 4) were selected for FTIR analysis. The chosen samples were: *i)* all supernatants *ii)* first permeates at $t = 0$ days which can be considered as representatives of all permeates as constant HPSEC profiles were obtained for all permeates and *iii)* for bound EPS, samples R1 at $t = 0$ days and $t = 28$ days and sample R2 at $t = 0$ days. In this latter case, no sample at a later time was investigated as no changes in the HPSEC profiles were observed with increasing time.

FTIR spectra are presented in figure 6.

Spectra corresponding to permeates and bound EPS (figures 6b, 6e, 6c and 6f) display broad infrared bands with relatively low intensity. Whatever the supernatant sample (figures 6a and 6d), all IR spectra display similar features with six characteristic bands at 835, 1067, 1370, 1616, 2934 and 3370 cm^{-1} . Sample R2 does not seem to exhibit any significant variation with time, whereas in sample R1, the intensity of the IR bands increases with increasing time with no variations in band positions. This reveals that the addition of anticancer treatment provokes an increase in the concentration of the various chemical species without any chemical change.

The IR profile of samples corresponds to the presence of various species. In order to determine in supernatant R1, which band combinations correspond to a given species, we have analyzed the evolution with time of the bands intensity ratio or band area ratio. As both treatments provide similar results, only the evolution of intensity will be presented in the following section. Figure 7 presents the time evolution of the intensity ratio of various band combinations. The approach used here was based on the two following assumptions: *i)* constant band ratios are assigned to the same chemical species, *ii)* evolving ratios are linked to bands that do not correspond to the same species. This approach can only be applied when a significant evolution in the global infrared response with time is observed, therefore it was applied only to the infrared profiles of figure 6a (R1(S)). Using such an analysis, it appears that the bands at 3370, 2934 and 1067 cm^{-1} belong to the same species (figure 7a). The same is true for the bands at 1616 and 1370 cm^{-1} (figure 7b), whereas the band at 835 cm^{-1} is characteristic of a third chemical group (figure 7c). These profiles are characteristics of the IR fingerprint of the major chemical species present in the samples. The first band combination formed by bands at 3370, 2934 and 1067 cm^{-1} is typical of a polysaccharide species. The second combination formed by bands at 1616 and 1370 cm^{-1} seems to indicate the presence of an amine or amide species and is therefore likely

indicative of protein-type moieties. However, this last IR profile does not allow the complete identification of the chemical family. Indeed, it is likely that either of these species should exhibit additional IR signals around 3300 cm^{-1} and around 1000 cm^{-1} that are masked by the presence of the dominant polysaccharide. Band intensity ratio analysis is not able to assign the minority contributions to a given IR profile. Finally the band at 835 cm^{-1} characterizes inorganic nitrate groups.

Once the various species are identified, it is possible to follow their evolution with time by using one of their characteristic bands. Polysaccharides were followed through their signal at 1067 cm^{-1} , proteins were analyzed at 1616 cm^{-1} whereas nitrate evolution was related to the band at 835 cm^{-1} . In order to compare the case with anticancer treatment to the control reactor, such an evolution was plotted for both cases. In the control reactor (figure 8b), only a very slight increase of the polysaccharide is observed, though this may be linked to experimental problems related to the not perfectly constant size of the analyzed droplet. In contrast, a significant evolution of both polysaccharide and protein is observed in the treated reactor (figure 8a) with constant nitrate. The increase in polysaccharide appears stronger than that in protein.

4. Conclusion

The four weeks lasting experience with a membrane reactor operating under steady conditions in presence of cytostatic drug and compared with a control reactor clearly demonstrated that the biomass behaviour was modified in presence of anticancer drug and its metabolites.

The stress of the biomass exposed to cytostatic drug induced a significant increase of EPS concentration, as was shown by HPSEC, FTIR and classic total protein and total polysaccharides analysis. The HPSEC showed clearly a progressive increase principally of large molecular weight species mainly soluble and present in the supernatant, in a less extent also for the bound EPS in the sludge. Infrared approach has shown that the global IR response of EPS can be described as the combination of mainly three major chemical species: polysaccharide, amide or amine and nitrate respectively. Infrared and UV-Vis analyses have shown that it was mainly the polysaccharide concentration which rose in the supernatant and in a less extent also that of proteins.

The retention of the soluble higher molecular organic matter by membrane of the reactor with anticancer drug was responsible for the more frequent membrane fouling compared with the control reactor. The chromatographic analysis showed also that the membrane filtration was very efficient, both permeates (reactor with CPs and the control reactor) had the same characteristics (very low protein and polysaccharides concentrations) in spite of a much higher concentration of EPS in reactor liqueur in CPs presence.

This work brings a new highlight to a very complex problem of impact (not yet known and understood) of presence of drug residues in waste water treatment plants. The effectiveness of membrane technologies in water purification was here clearly demonstrated, however the general impact of different residual drugs on the biomass behaviour, is a vast object of studies. Besides a probable harmful effect of different drugs on bacteria consortium, we have seen here also a technological impact, a filtration membrane fouling by the stimulated EPS production.

References

- Al-Halbouni D., Traber J., lyko S., Wintgens T., Melin T., Tacke D., Janot A., Dott W., Hollender J. (2007) Correlation of EPS content in activated sludge at different sludge correlation times with membrane fouling phenomena. Water Research, in press, doi :10.1016/j.watres.2007.10.026.
- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater. Greenberg A., Clesceri L., Eaton A. (eds) 20th Ed. Washington, D.C.
- Aquino S.F., Stuckey D.C. (2004) Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. Water Research 38 (2), 255-266.
- Bae T.H., Tank T.M. (2005) Interpretation of fouling characteristics of ultrafiltration membranes during the filtration of membrane bioreactor mixed liquor. Journal of Membrane Science 264 (1-2), 151-160.
- Barker D. and Stuckey D. (1999) A review of soluble microbial products (SMP) in wastewater systems. Water Research 33 (14), 3063-3082.
- Bernhard M., Muller J., Knepper T.H. (2006) Biodegradation of persistent polar pollutants in wastewater: comparison of an optimised lab-scale membrane bioreactor and activated sludge treatment. Water Research 40 (18), 3419-3428.
- Chang I.S., Le Clech P., Jefferson B. and Judd S. (2002) Membrane fouling in membrane bioreactors for wastewater treatment. Journal of Environmental Engineering 128 (11), 1018-1029.

385 Delgado L.F., Audran M., Faucet-Marquis V., Pfohl-Lleszkowicz A., Schetrite S., Guibaud J.,
 386 Castegnaro M., Albasi C. (2008) Performance of a crossflow Membrane Bioreactor for
 387 Hospital Wastewater Treatment: Feasibility?. Water Science and Technology. Accepted.

388 Drews A., Vocks M., Iversen V., Lesjean B. Kraume M. (2006) Influence of unsteady
 389 membrane bioreactor operation on EPS formation and filtration resistance. Desalination 192
 390 (1-3), 1-9.

391 Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F. (1956) Colorimetric method
 392 for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28 (3), 350–356.

393 Everst S. (2006) Bacterial conversations. C&EN Washington. Oct. 23, 17-26p.
 394 <http://www.CEN-online.org>.

395 Finlayson J.C., Liao B., Droppo T.G., Leppard G.G., Liss S.N. (1998) The relationship
 396 between the structure of activated sludge flocs and the sorption of hydrophobic pollutants.
 397 Water Science and Technology 37 (4-5), 353-357.

398 Frolund B., Palmgren R., Keiding K., Nielsen P.H. (1996) Extraction of extracellular
 399 polymers from activated sludge using a cation exchange resin. Water Research 30 (8), 1749-
 400 1758.

401 Garnier Ch., Gorner T., Lartiges B., Abdelouhab S., de Donato Ph. (2005) Characterization of
 402 activated sludge exopolymers from various origins: A combined size-exclusion
 403 chromatography and infrared microspectroscopy study. Water Research 39 (13), 3044-3054.

404 Görner T., de Donato Ph., Ameil M.H., Montarges E., Lartiges B. (2003) Activated sludge
 405 exopolymers: separation and identification using size exclusion chromatography and infrared
 406 micro-spectroscopy. Water Research 37 (10), 2388-2393.

407 Henriques I.D.S., Love N.G. (2007) The role of extracellular polymeric substances in the
 408 toxicity response of activated sludge bacteria to chemical toxins. *Water Research* 41 (18),
 409 4177-4185.

410 Hernandez Rojas M.E., Van Kaam R., Schetrite S. Albasi C. (2005) Role and variation of
 411 supernatant compounds in submerged membrane bioreactor fouling. *Desalination* 179 (1-3),
 412 95-107.

413 Janga N., Ren X., Kim G., Ahn Ch. Cho J., Kim I.S. (2007) Characteristics of soluble
 414 microbial products and extracellular polymeric substances in the membrane bioreactor for
 415 water reuse. *Desalination* 202 (1-3), 90-98.

416 Joss A., Zabczynski S., Göbel A., Hoffmann B., Löffler D., McArdell C.S., Ternes T.A.,
 417 Thomsen A., Siegrist H. (2006) Biological degradation of pharmaceuticals in municipal
 418 wastewater treatment: Proposing of classification scheme. *Water Research* 40 (8), 1686-1696.

419 Lee W.N., Chang I.S., Hwang B.K., Park P.K., Lee C.H., Huang X. (2007) Changes in
 420 biofilm architecture with addition of membrane fouling reducer in a membrane bioreactor.
 421 *Process Biochemistry* 42 (4), 655-661.

422 Le-Clech Pierre, Chen Vicki, Fane Tony A.G.(2006).Fouling in membrane bioreactors used in
 423 wastewater treatment. Review. *Journal of Membrane Science* 284, 17-53.

424 Liu Yan, Fang Herbert H.P. (2003) Influences of extracellular Polymeric substances (EPS) on
 425 flocculation, settling and dewatering of activated sludge. *Critical Reviews in Environmental*
 426 *Science and Technology* 33 (3), 237-273.

427 Love N.G., Bott C.B. (2000) A review and needs survey of upset early warning devices.
 428 *Water Environmental Research Foundation*. Alexandria, V. A.

429 Lowry O.H., Rosebrough N. J., Farr A.L., Randall R. J. (1951) Protein measurement with the
 430 Folin-Phenol reagents. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.

431 Lyko S., Al-Halbouni D., Wintgens T., Janot A., Hollender J., Dott W., Melin T. (2007)
 432 Polymeric compounds in activated sludge supernatant-characterisation and retention
 433 mechanism at a full scale municipal membrane bioreactor. *Water Research* 41 (17), 3894-
 434 3902.

435 Marcotte L., Kegelaer G., Sandt Ch., Barbeau J., Lafleur M. (2007) An alternative infrared
 436 spectroscopy assay for the quantification of polysaccharides in bacterial samples. *Analytical*
 437 *Biochemistry* 361 (1), 7-14.

438 Meng F., Yang F. (2007) Fouling mechanisms of deflocculated sludge, normal sludge and
 439 bulking sludge in membrane bioreactor. *Journal of Membrane Science* 305 (1-2), 48-56.

440 Meng F., Zhang H., Yang F., Zhang S., Li Y., Zhang X. (2006) Identification of activated
 441 sludge properties affecting membrane fouling in submerged membrane bioreactors.
 442 *Separation and Purification Technology* 51 (1), 95-103.

443 Nielsen P.H., Jahn A. (1999) Extraction of EPS. In: Wingender, J., Neu T.R., Flemming H.C.
 444 (Eds.), *Microbial Extracellular Polymeric Substances: characterization, structure and function*.
 445 Springer, Berlin, Germany. p.21-47.

446 Nuengjamnong Ch., Kweon J.H., Cho J., Polprasert Ch., Ahn K-H. (2005) Membrane fouling
 447 caused by extracellular polymeric substances during microfiltration processes. *Desalination*
 448 179 (1-3), 117-124.

449 Quintana J.B., Weiss S., Reemtsma T. (2005) Pathways and metabolites of microbial
 450 degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater
 451 treated by a membrane bioreactor. *Water Research* 39 (12), 2654-2664.

452 Rosenberg S., Laabs C., Lesjean B., Gnirss R., Amy G., Jekel M., Schrotter J.C. (2006)
 453 Impact of colloidal and soluble organic material on membrane performance in membrane
 454 bioreactors for municipal wastewater treatment. *Water Research* 40 (4), 710-720.

455 Stephenson T., Brindle K., Judd S., Jefferson B. (2000) *Membrane Bioreactors for*
 456 *Wastewater Treatment*. IWA publishing, London, United Kingdom. ISBN: 9781900222075.

457 Tansel B., Sager J., Garland J., Xu S., Levine L., Bisbee P. (2006) Deposition of extracellular
 458 polymeric substances (EPS) and microtopographical changes on membrane surfaces during
 459 intermittent filtration conditions. *Journal of Membrane Science* 285 (1-2), 225-231.

460 Tsuneda S., Aikawa H., Hayashi H., Yuasa A., Hirata A. (2003) Extracellular polymeric
 461 substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiology Letters*
 462 223 (2), 287-292.

463 Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. (1999) What are bacterial extracellular polymer
 464 substances?. In : Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. (eds.): *Microbial Extracellular*
 465 *Polymeric Substances*. Springer, Heidelberg, p. 1-19.

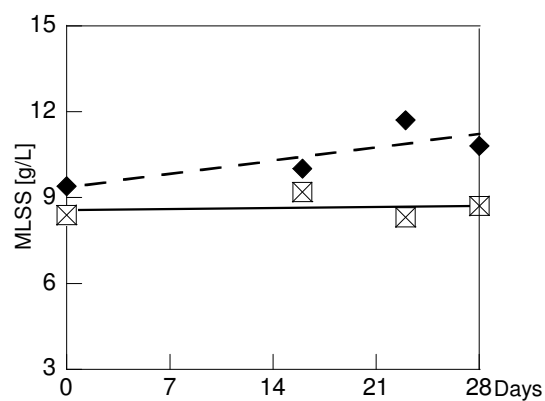


Figure 1. Evolution of MLSS (Mixed Liquor Suspended Solids) with reactor running time.

⊠ R1 (with CPs) and ♦ R2 (control)

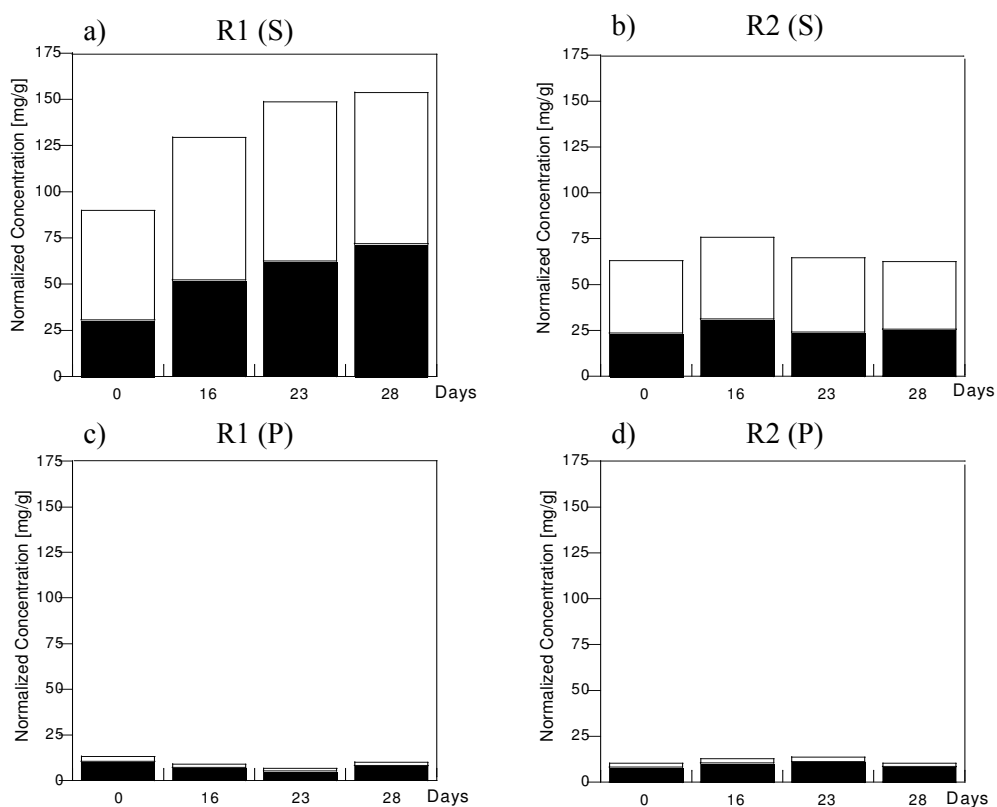


Figure 2. Evolution of normalized concentrations of PR and PS (per g. of MLSS) with the running time of R1 and R2 bioreactors: a) and b) in supernatants and c) and d) in permeates respectively. ■ PR □ PS

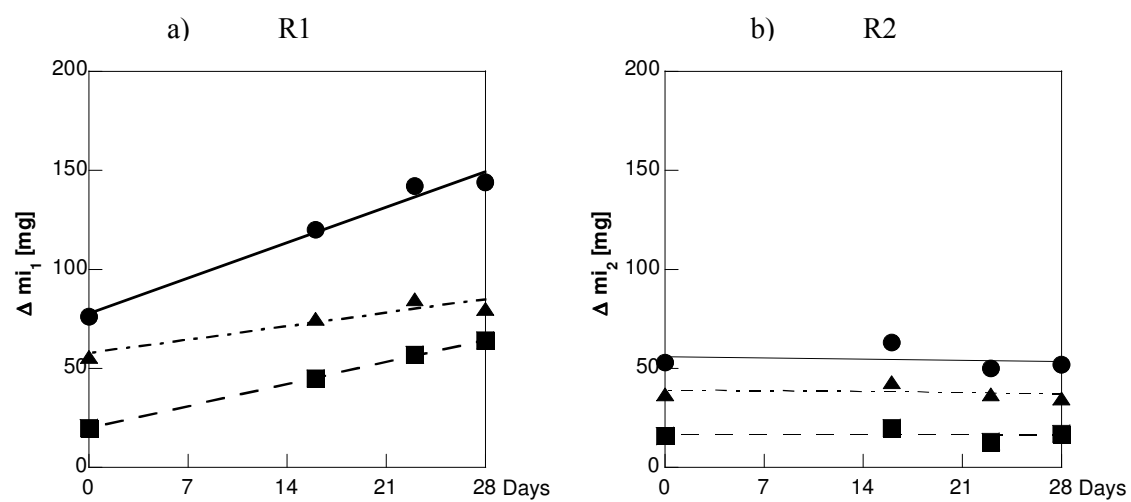


Figure 3. Evolution with a time of total amount (Δm_i) of PR, PS retained by membranes.

■ PR ▲ PS ● PR + PS

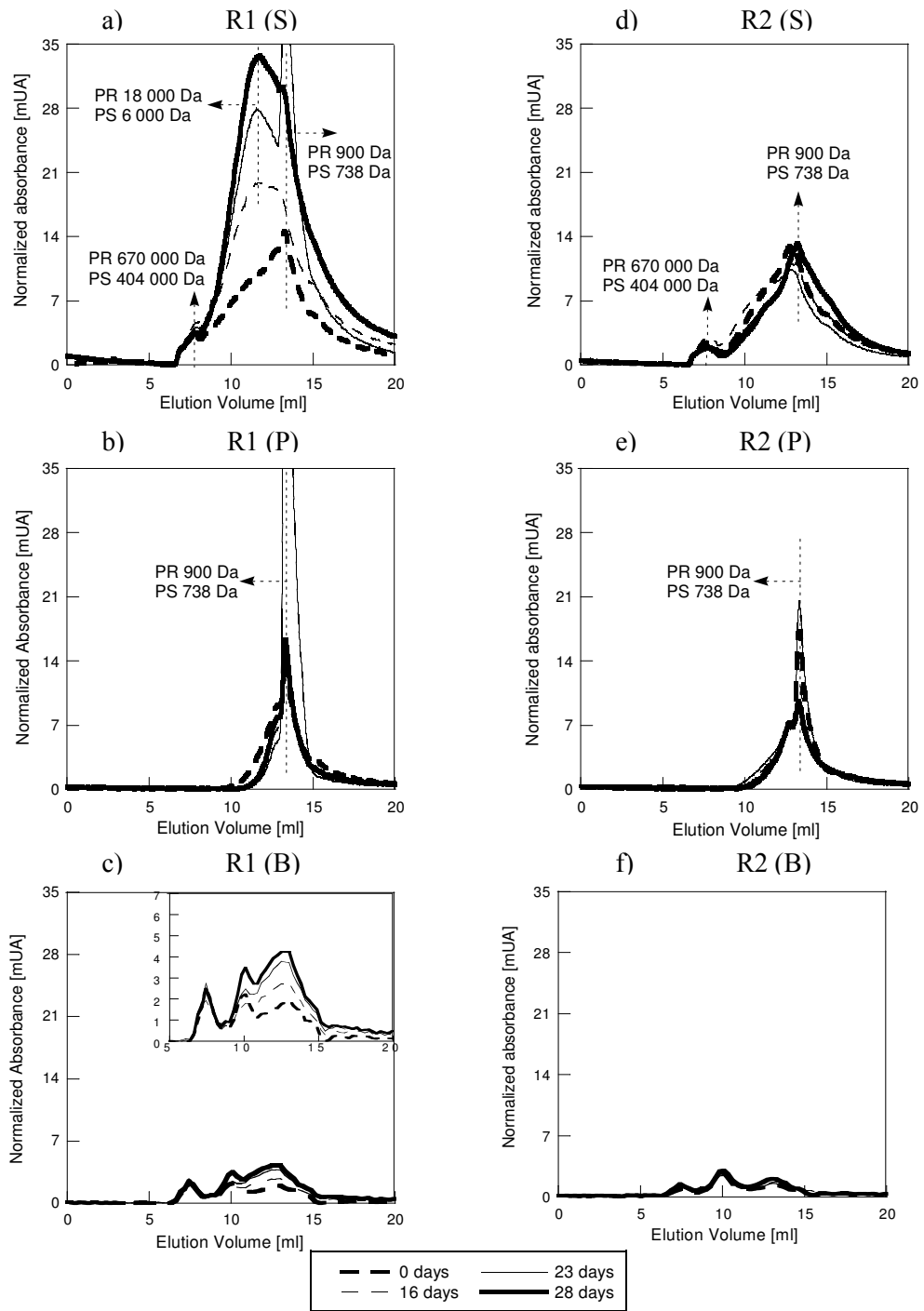


Figure 4. Normalized chromatograms of soluble EPS present in supernatants (a and d) and in permeates (b and e) and normalized chromatograms of bound EPS (c and f) in reactors R1 and R2 respectively. Evolution with reactors running time.

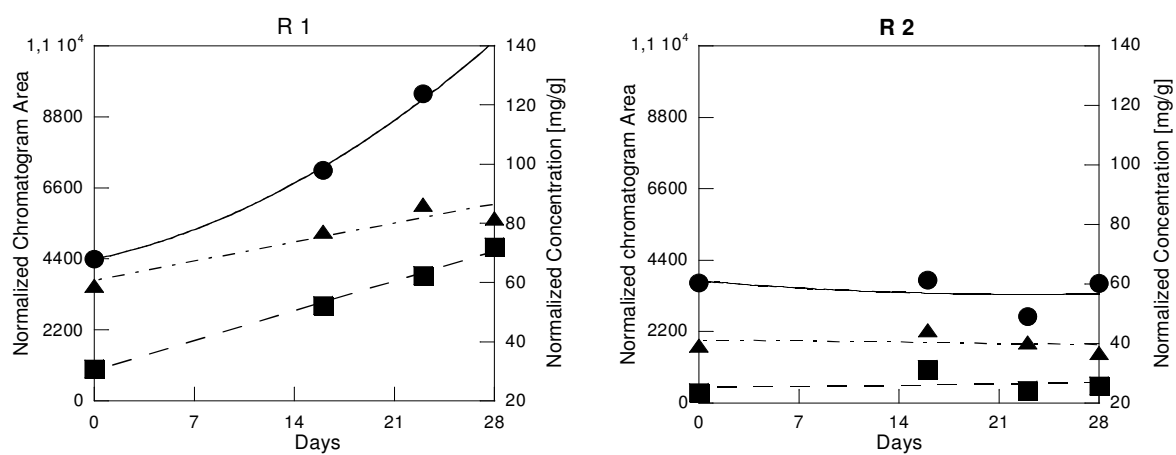


Figure 5. Evolution with time of normalized chromatogram area and of normalized PR and PS concentrations for supernatants in reactors R1 and R2.

● chromatogram area ■ PR concentration ▲ PS concentration.

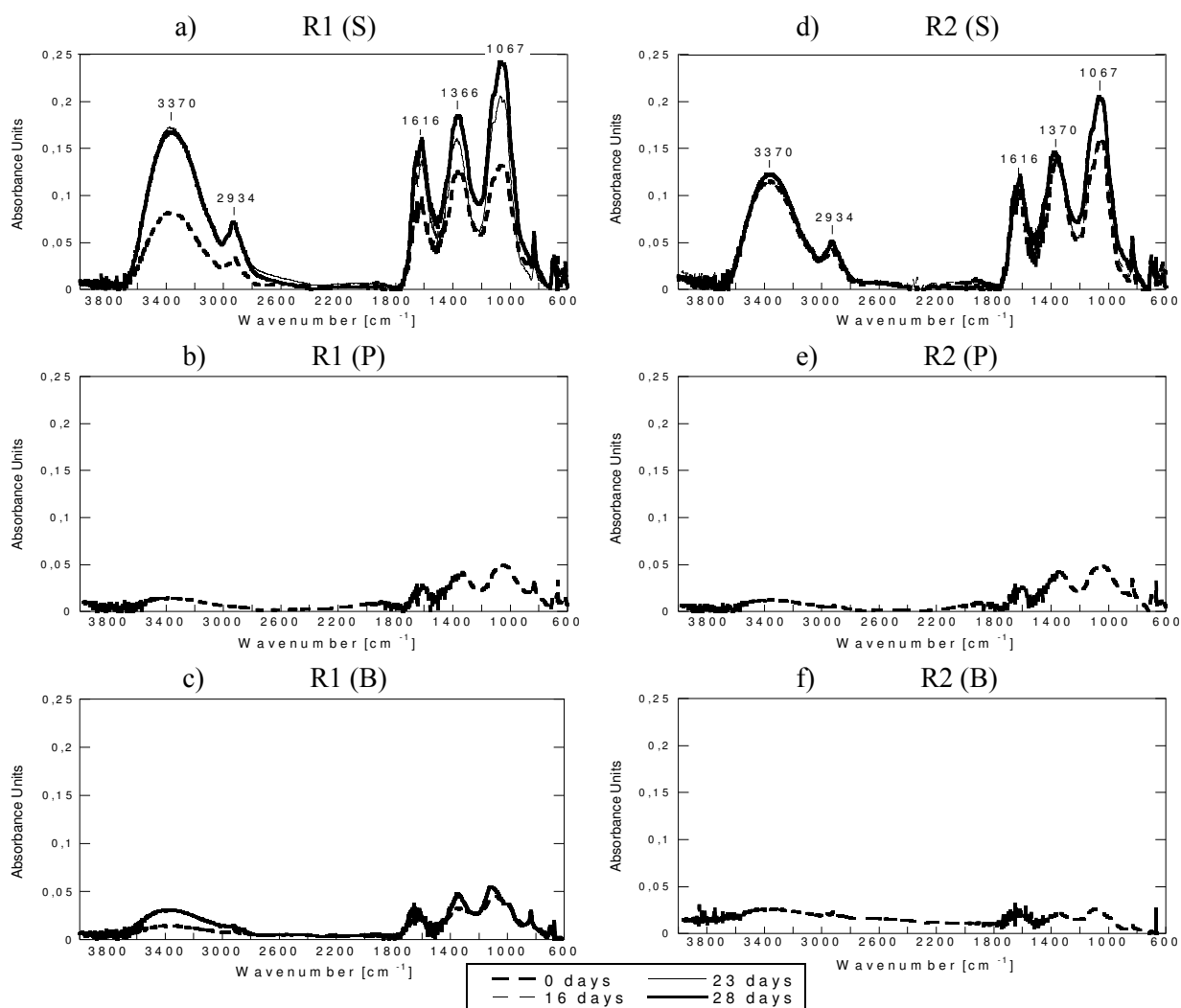


Figure 6. Evolution with time of IR spectra of supernatants (S), permeates (P) and bound EPS (B) in the R1 and R2 reactors.

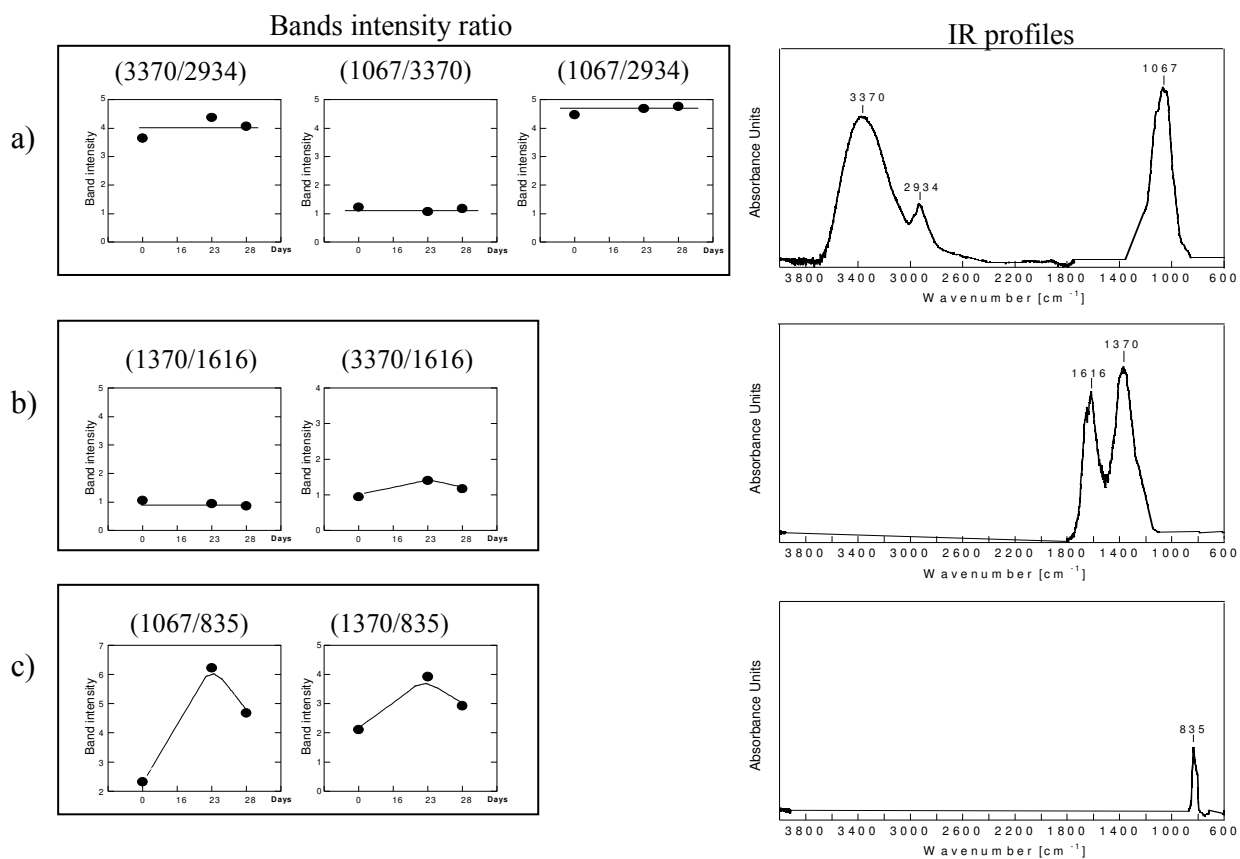


Figure 7. Determination of the IR profiles of the major chemical species present in the R1 supernatant using the cross comparison of band intensity ratio (3370, 2934, 1616, 1370, 1067 and 835 cm^{-1}). Bands intensity ratio remains constant in the time for bands belonging to the same molecule. In contrast, band intensity ratio evolves with the time for bands do not belonging to the same molecule.

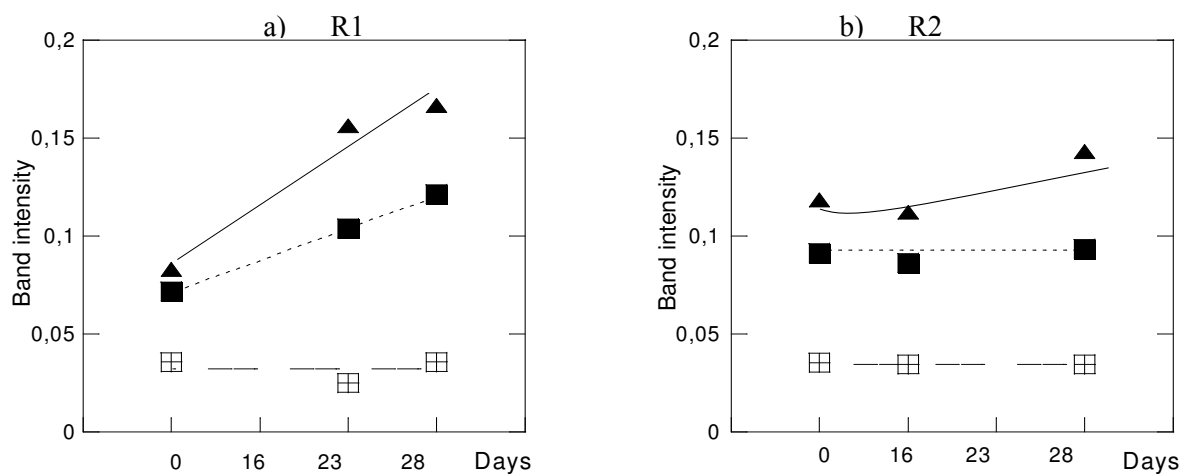


Figure 8. Evolution in the time of polysaccharide, amine/amide and nitrate species in the supernatant of reactor R1 and R2. Polysaccharide evolution (▲) was determined using the IR band at 1067 cm^{-1} , amine/amide evolution (■) was determined using the IR band at 1616 cm^{-1} and nitrate evolution (⊞) was determined using the IR band at 835 cm^{-1} .

Annexe 7. Figures présentant les résultats des tests de cytotoxicité et de génotoxicité. (Virginie Faucet-Marquis, Projet ANR TOXEAUBAM)

Il est clair qu'un test unique n'est pas capable de détecter tout le caractère toxique d'une substance, c'est pour quoi une batterie de test est mise en place. Elle comprend des tests de génotoxicité et de cytotoxicité. La difficulté réside dans le fait que l'on se trouve face à des composés présents en quantité très faible, dès lors détecter leurs effets toxiques s'avère difficile. Deux sortes de test ont été mis en place, des test spécifiques sur des produits ciblés mais aussi des tests plus classiques qui permettront aussi d'évaluer s'il y a eu formation des nouveaux composés toxiques.

Les analyses de toxicité sont réalisées sur des échantillons prélevés en entrée, dans le surnageant et dans le perméat des bioréacteurs, à différentes dates. Les données sont indiquées en fonction du nombre de jour de fonctionnement des bioréacteurs.

A7.1 Tests de cytotoxicité. Campagne expérimentale I.

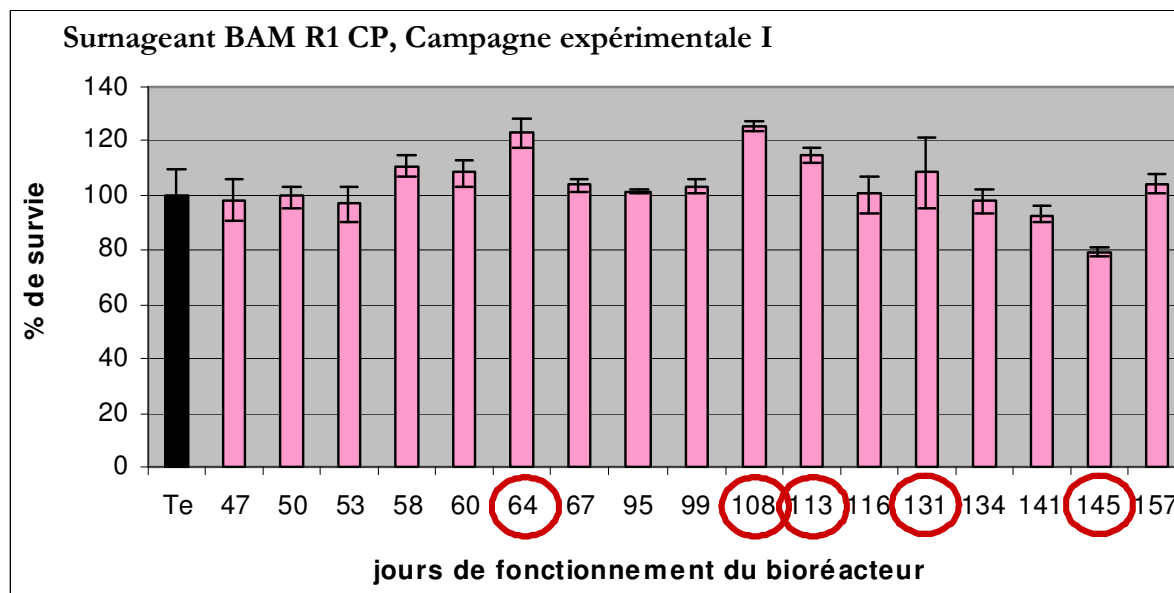


Figure A7.1.1 : Evolution de la viabilité cellulaire dans le surnageant du BAM R1 CP en fonction du nombre de jours de fonctionnement. Campagne expérimentale I.

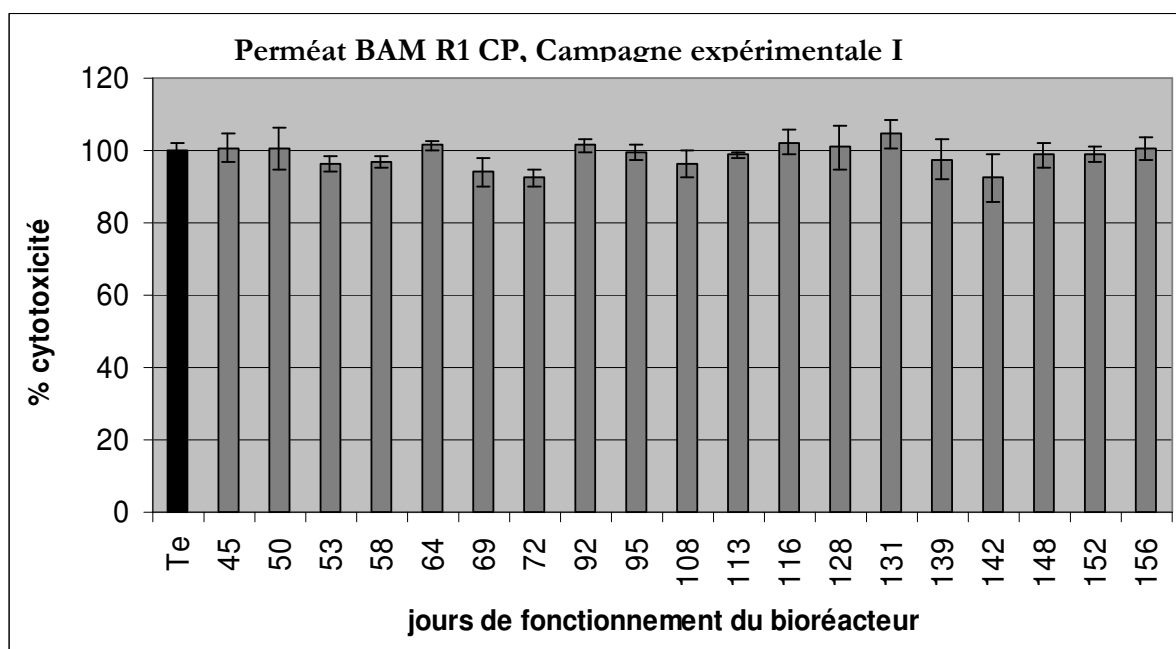


Figure A7.1.2 : Evolution de la viabilité cellulaire dans le perméat du BAM R1 CP en fonction du nombre de jours de fonctionnement. Campagne expérimentale I.

A7.2 Tests de génotoxicité (Test des comètes). Campagne expérimentale I.

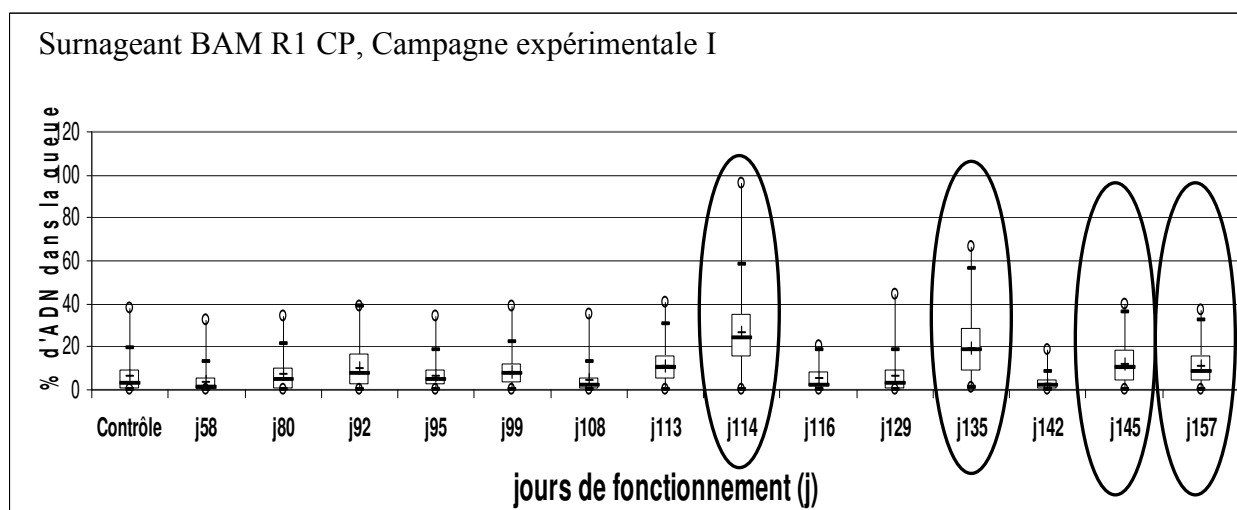


Figure A7.2.1 : Test de comètes. Surnageant du BAM R1 CP en fonction du nombre de jours de fonctionnement. Campagne expérimentale I.

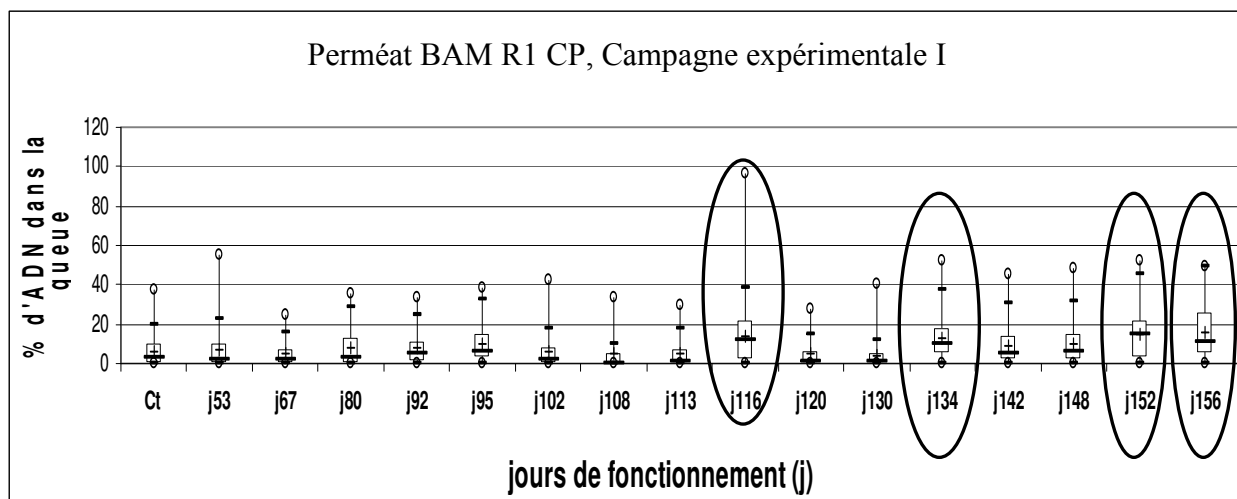


Figure A7.2.2 : Test de comètes. Perméat du BAM R1 CP en fonction du nombre de jours de fonctionnement. Campagne expérimentale I.

A7.3 Tests de cytotoxicité. Campagne expérimentale II.

Suivi sur six jours de prélèvements :

- 10 avril 2008 => jour 159
- 28 avril 2008 => jour 177
- 14 mai 2008 => jour 193
- 21 mai 2008 => jour 200
- 28 mai 2008 => jour 207
- 4 juin 2008 => jour 214

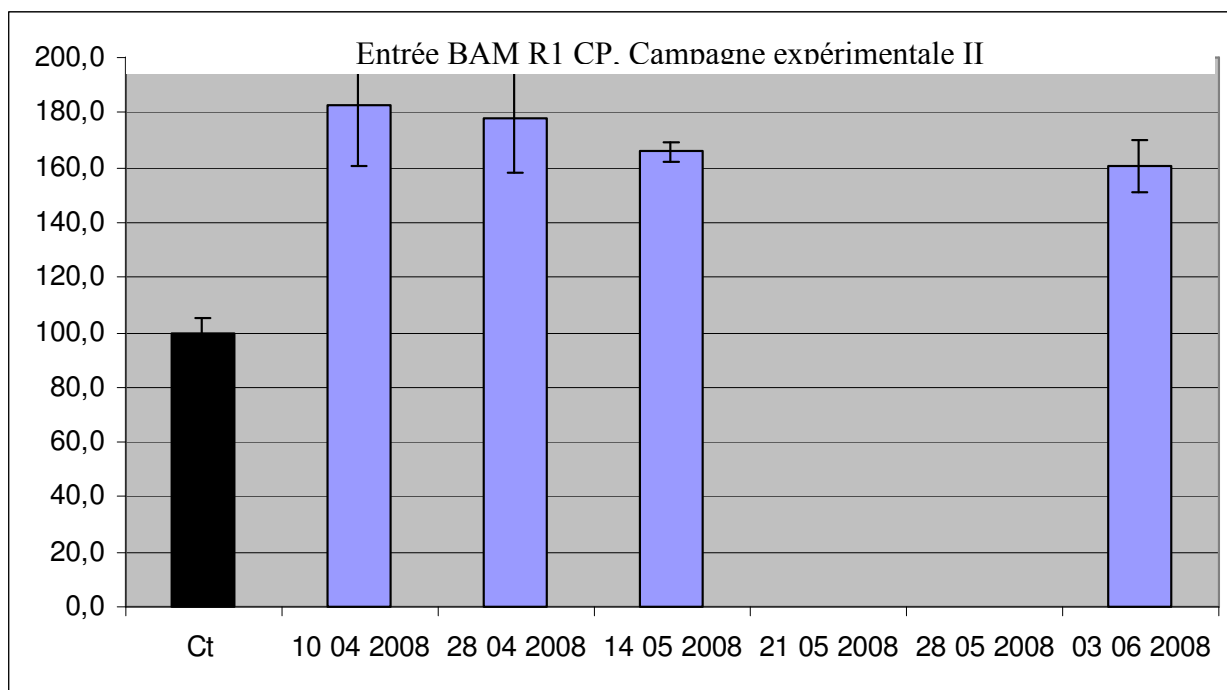


Figure A7.3.1 : Evolution de la viabilité cellulaire à l'entrée du BAM R1 CP en fonction du nombre de jours de fonctionnement. Campagne expérimentale II.

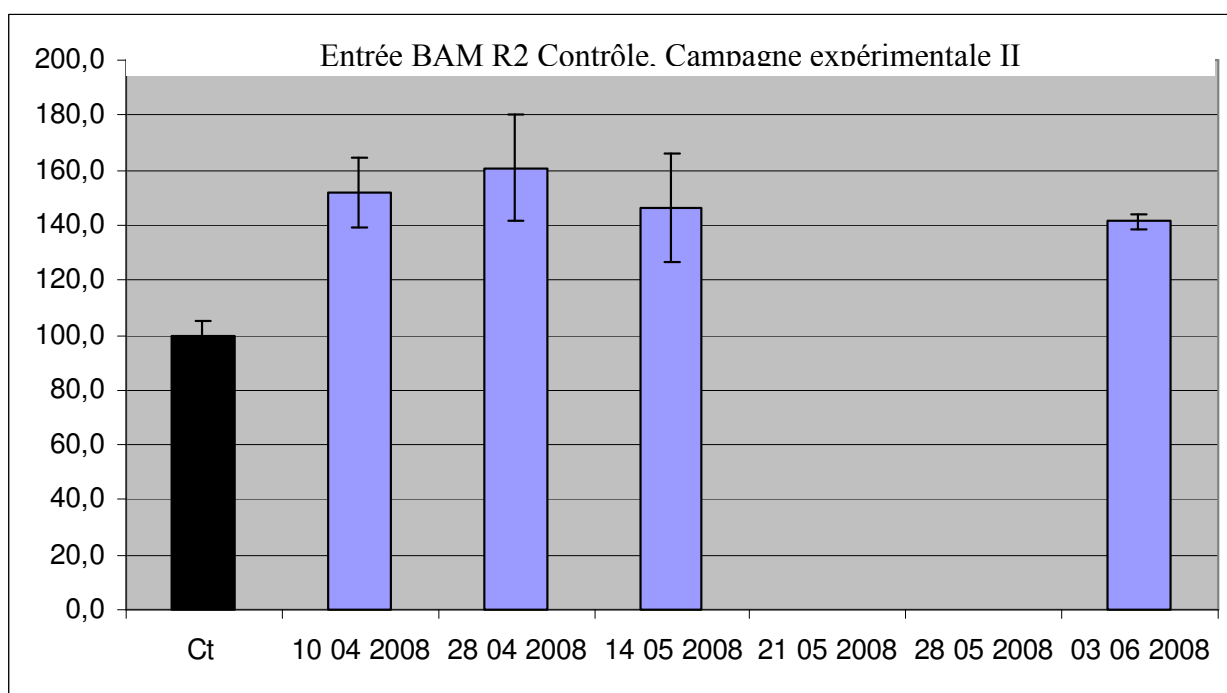


Figure A7.3.2 : Evolution de la viabilité cellulaire à l'entrée du BAM R2Contrôle en fonction du nombre de jours de fonctionnement. Campagne expérimentale II.

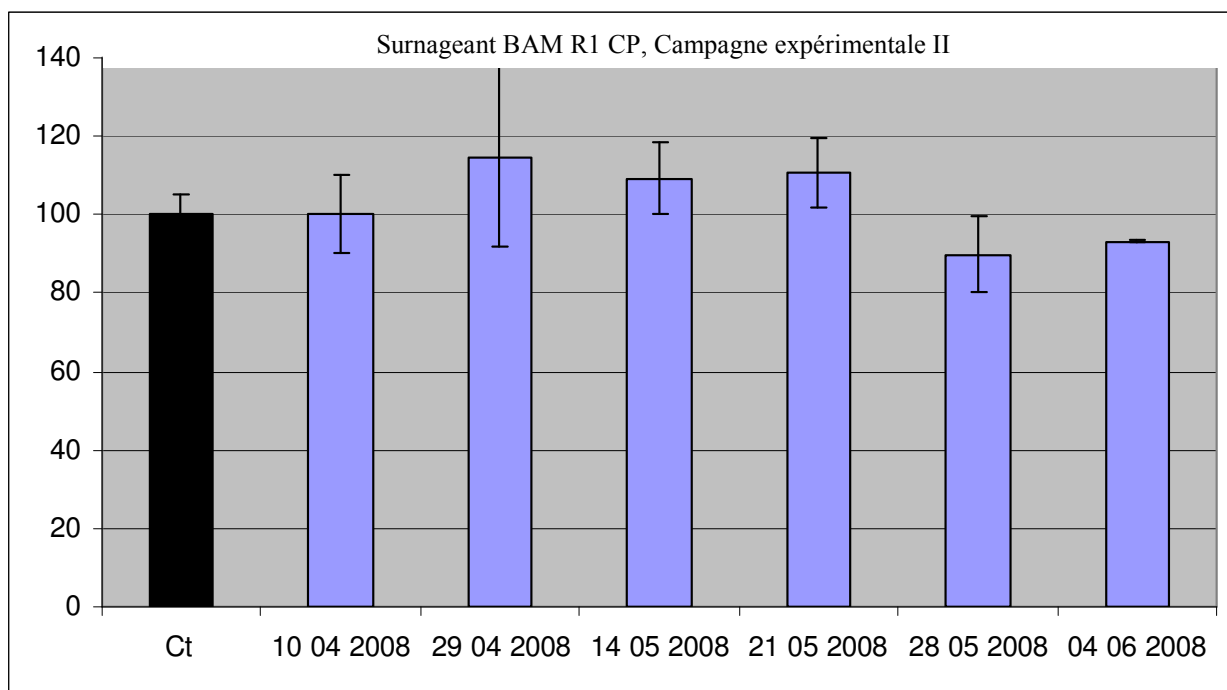


Figure A7.3.3 : Evolution de la viabilité cellulaire dans le surnageant du BAM R1 CP en fonction du nombre de jours de fonctionnement. Campagne expérimentale II.

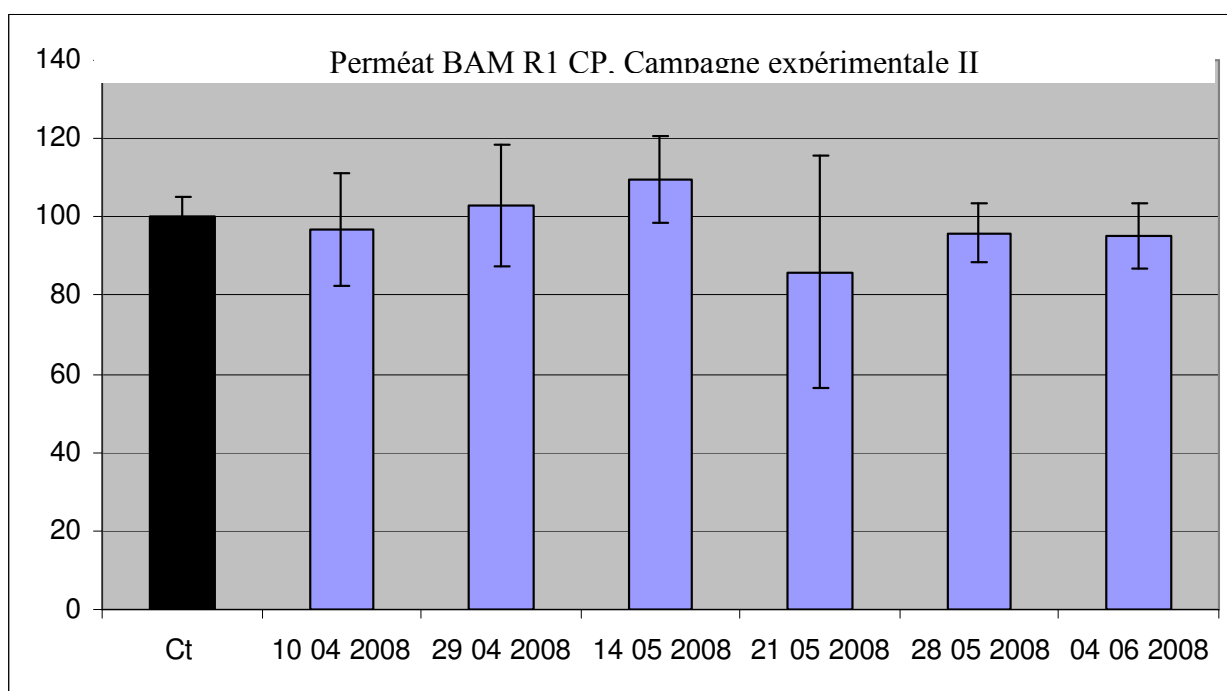


Figure A7.3.4 : Evolution de la viabilité cellulaire dans le perméat du BAM R1 CP en fonction du nombre de jours de fonctionnement. Campagne expérimentale II.

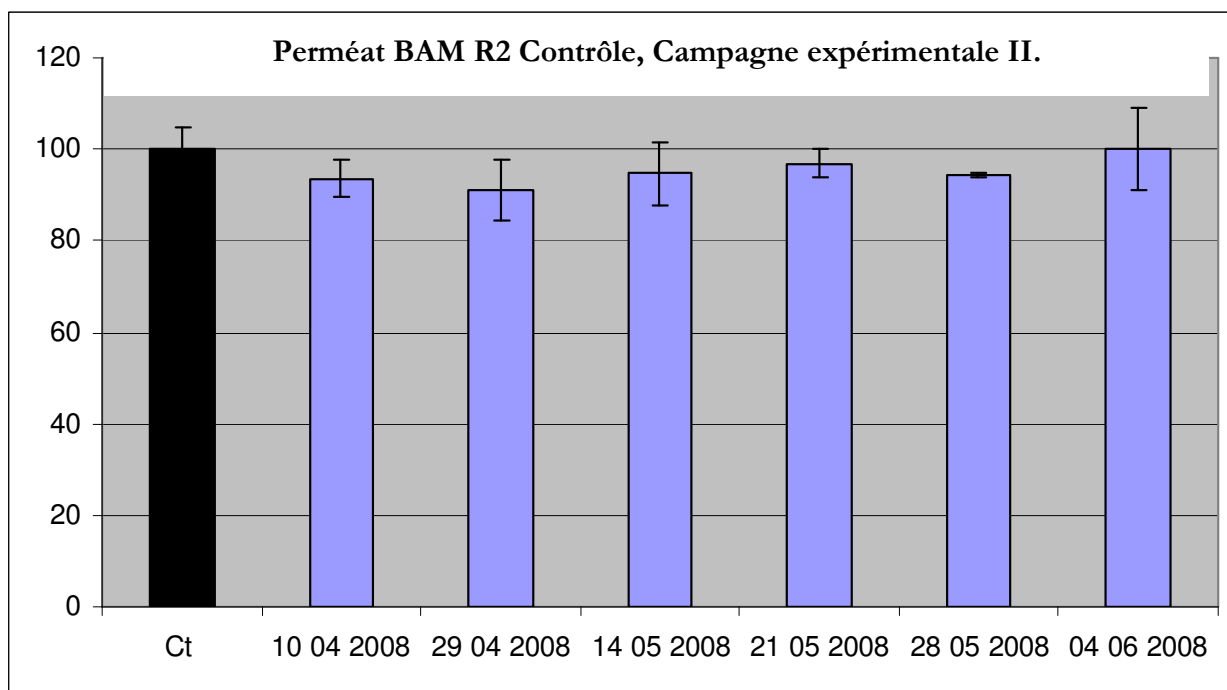
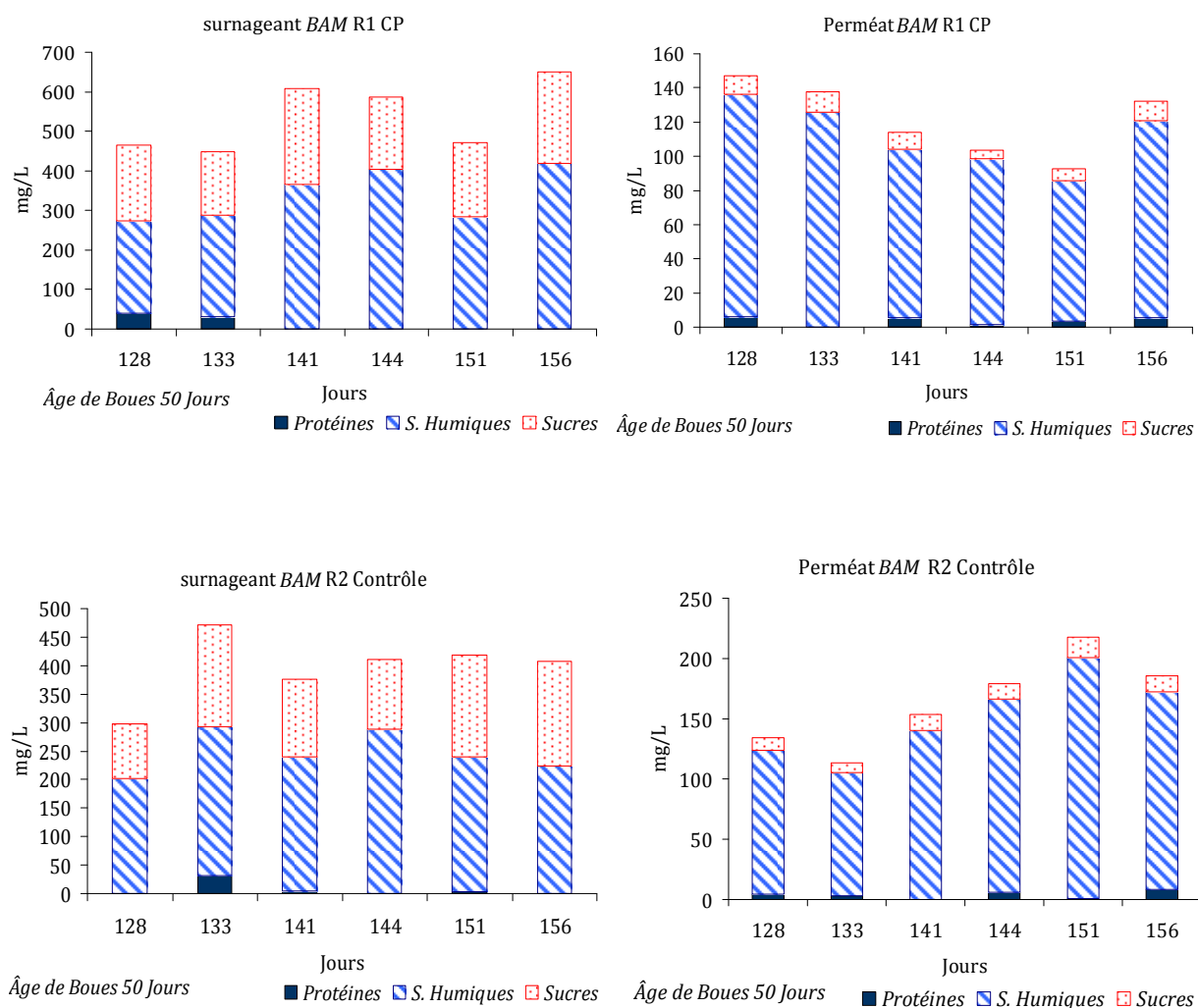


Figure A7.3.5 : Evolution de la viabilité cellulaire dans le perméat du BAM R2 Contrôle en fonction du nombre de jours de fonctionnement. Campagne expérimentale II.

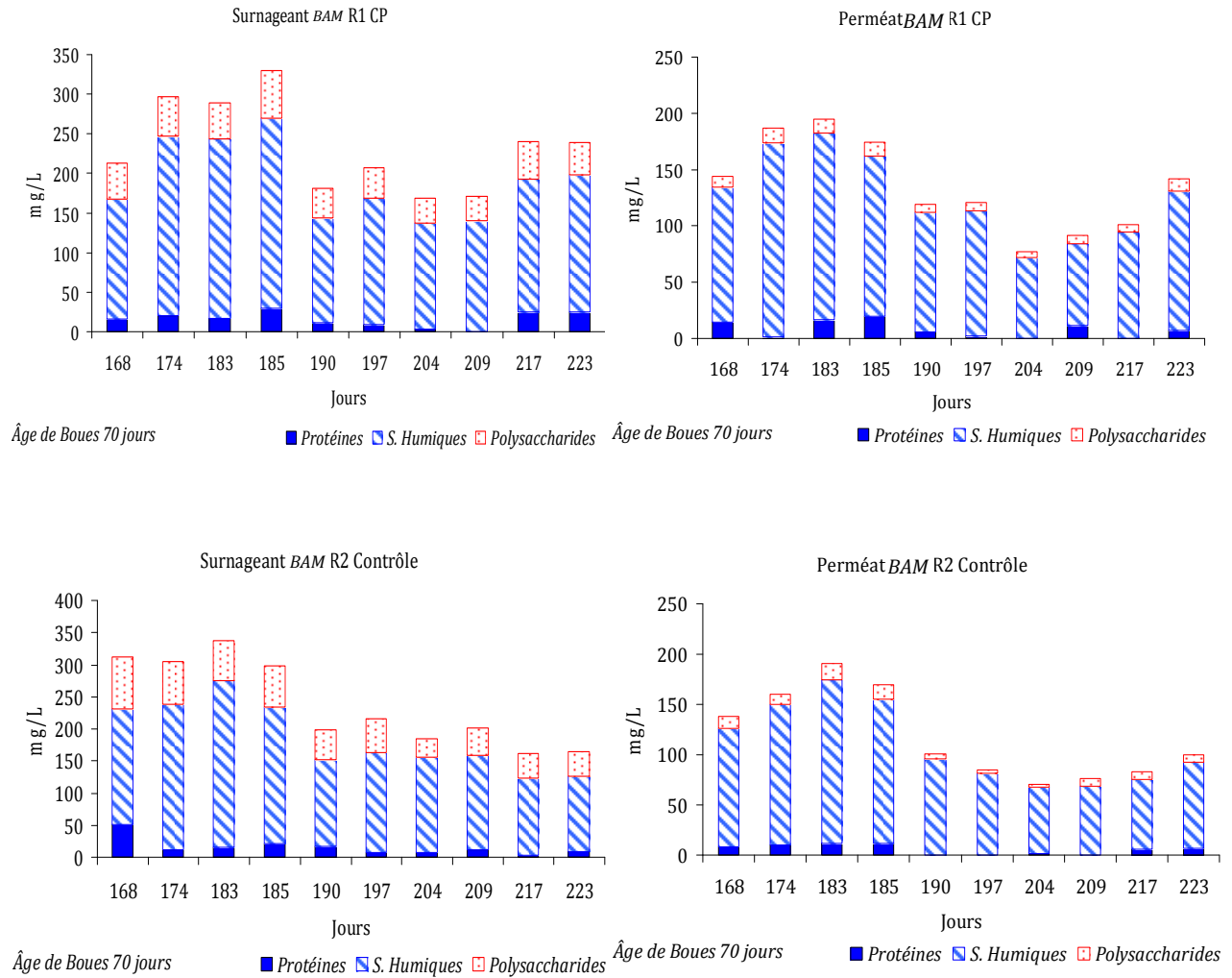
Annexe 8. Rôle de la membrane dans la rétention d'EPS et dans la qualité du perméat

A8.1 Rétention d'EPS

Les figures A8.1.1 et A8.1.2 présentent l'évolution des concentrations en exopolymères (protéines, polysaccharides et substances humiques) dans les surnageants et dans les perméats en fonction du temps, lors des derniers jours des deux campagnes expérimentales. Nous rappelons que le dosage des protéines est perturbé par la présence des substances humiques. Une concentration importante en substances humiques peut dissimuler la présence de protéines lorsque celles-ci sont présentes à des faibles concentrations, d'autant plus que la concentration en substances humiques est élevée.



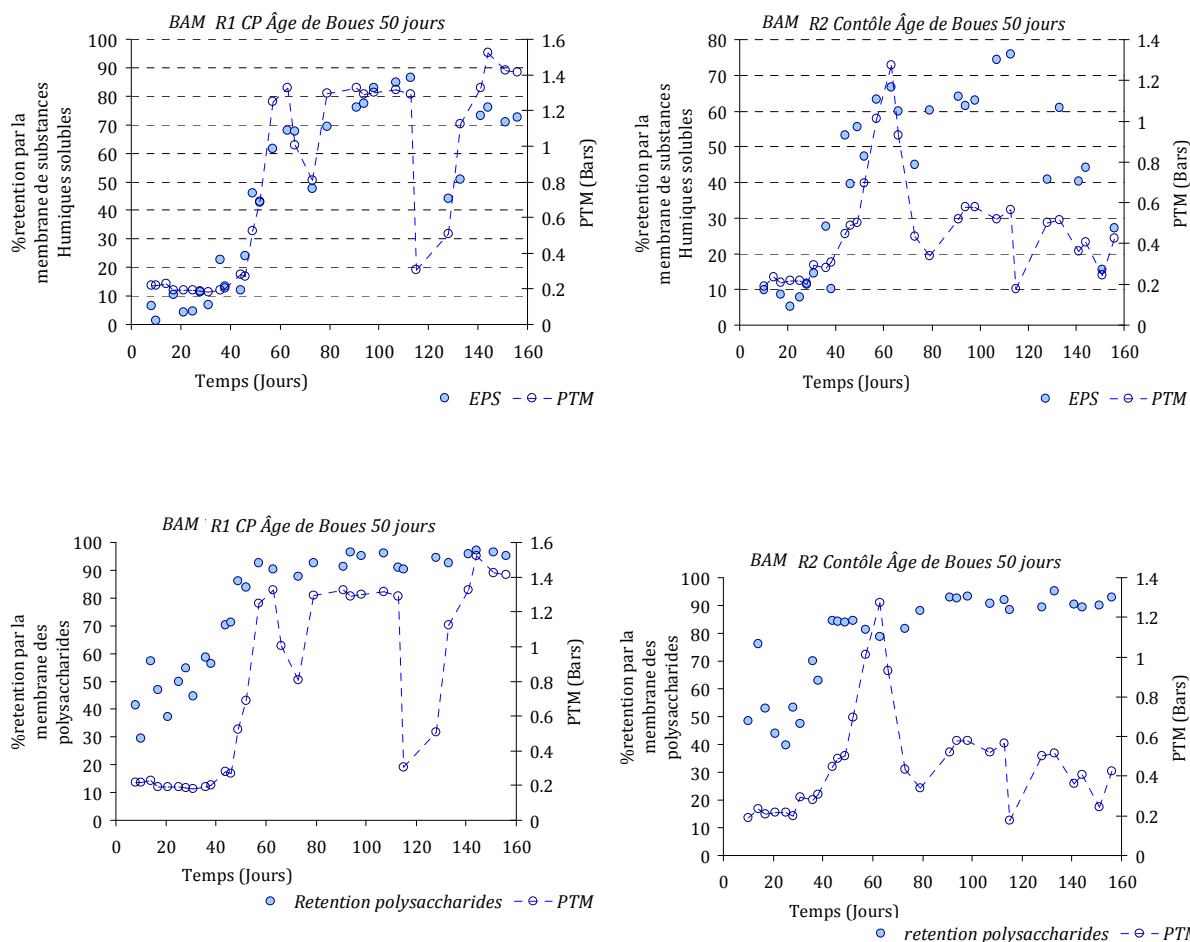
Figures A8.1.1 Evolution des concentrations en exopolymères (protéines, polysaccharides et substances humiques) dans les surnageants et dans les perméats en fonction du temps. Campagne expérimentale I.



Figures A8.1.2 Evolution des concentrations en exopolymères (protéines, polysaccharides et substances humiques) dans les surnageants et dans les perméats en fonction du temps. Campagne expérimentale II.

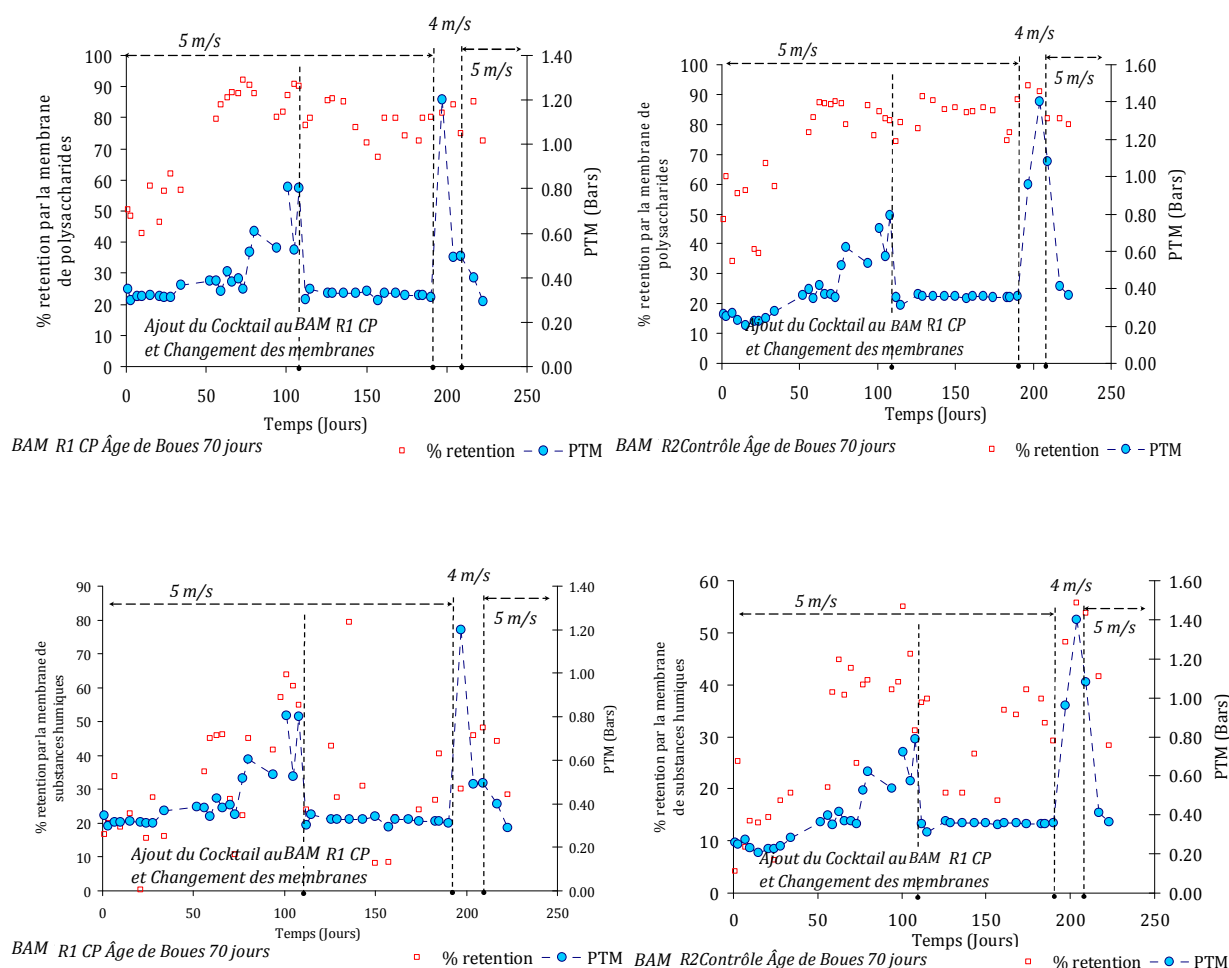
Durant les deux campagnes expérimentales, tant dans le surnageant comme dans le perméat des bioréacteurs, les substances humiques sont présentes en grande proportion, puis les polysaccharides et dans une moindre proportion, les protéines.

Afin d'observer le lien entre le pourcentage de rétention des exopolymères et le degré de colmatage de la membrane, nous présentons dans une même figure l'évolution du pourcentage de rétention de la membrane des substances humiques et des polysaccharides, ainsi que l'évolution de la pression transmembranaire en fonction du temps durant les deux campagnes expérimentales (figures A8.1.3 et A8.1.4).



Figures A8.1.3 Evolution du pourcentage de rétention de la membrane des substances humiques et des polysaccharides, ainsi que l'évolution de la pression transmembranaire en fonction du temps. Campagne expérimentale I.

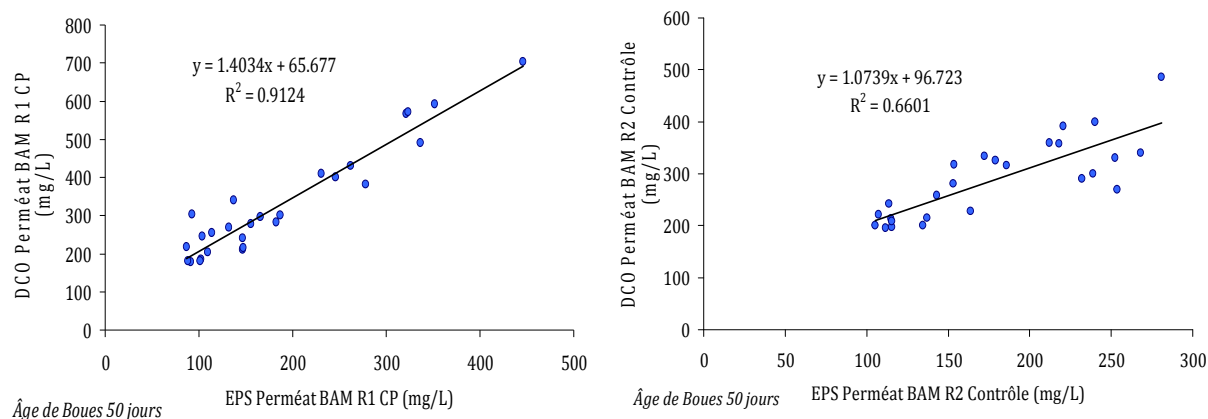
Durant les deux campagnes expérimentales nous observons que l'ensemble membrane+dépôt retient une grande partie des EPS dans le surnageant. Le taux de rétention des polysaccharides augmente progressivement atteignant des pourcentages de rétention supérieurs à 80%. Dans le cas des substances humiques, le pourcentage de rétention dépend plus étroitement du degré de colmatage de la membrane. Plus le colmatage est élevé plus le taux de rétention est important.



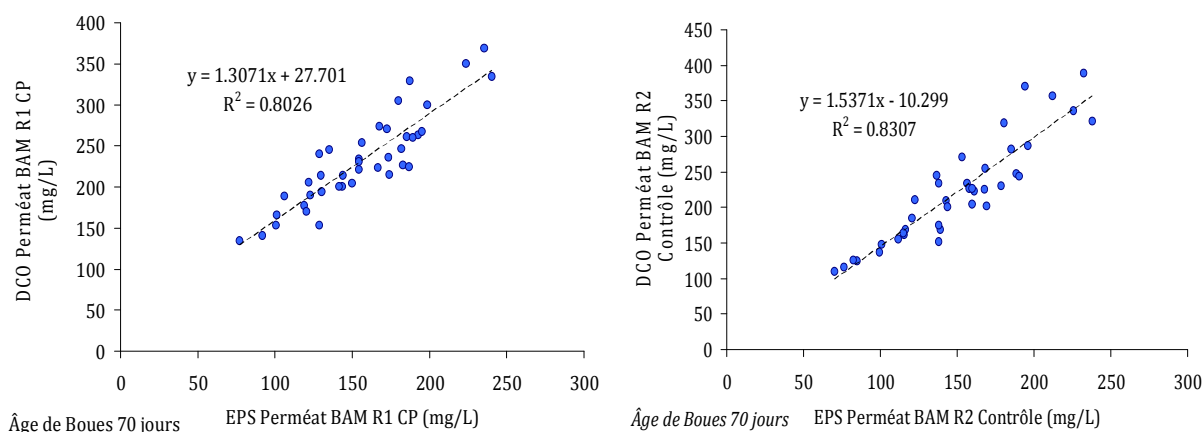
Figures A8.1.4 Evolution du pourcentage de rétention de la membrane des substances humiques et des polysaccharides, ainsi que l'évolution de la pression transmembranaire en fonction du temps. Campagne expérimentale II.

A8.2 Qualité du perméat

La qualité du perméat est mesurée ici par la concentration en DCO. Tel que nous l'avons observé au préalable, le perméat des bioréacteurs contiennent une grande quantité des exopolymères. Les figures A8.2.1 et A8.2.2 montrent le rapport entre la DCO du perméat et la concentration en exopolymères dans le perméat. Les concentrations en substances humiques, en polysaccharides et en protéines présent dans le perméat ont été regroupées dans un seul terme nommé EPS. Ce nouveau terme n'a pas vraiment un sens physique mais permet de diminuer le nombre de figures à présenter dans ce paragraphe tout en mettant en évidence le rapport existant entre les exopolymères et la DCO du perméat.

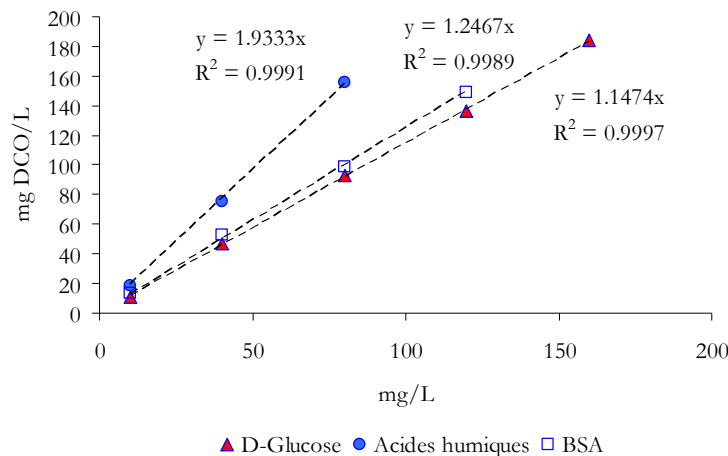


Figures A8.2.1 DCO dans le perméat en fonction de la concentration en EPS. Campagne expérimentale I.



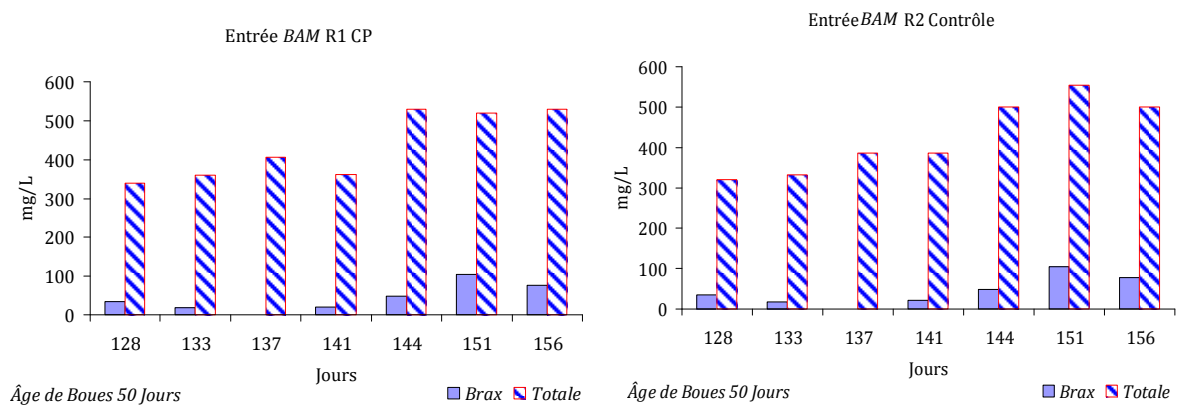
Figures A8.2.2 DCO dans le perméat en fonction de la concentration en EPS. Campagne expérimentale II.

Selon ces figures, la concentration en DCO dans le perméat des bioréacteurs est fortement liée à la concentration en EPS. Le rapport concentration en exopolymère/ DCO, pour des polysaccharides (équivalent glucose), des protéines (équivalent BSA) et des substances humiques (équivalent acides humiques) a été estimé comme suit (Figure A8.2.3) : 1mg Glucose/L = 1.15 mg DCO/L, 1mg BSA/L = 1.25 mg DCO/L, 1mg Acide humique/L = 1.93 mg DCO/L. L'apport le plus important correspond aux substances humiques. En outre, comme il a déjà été montré (figures A8.1.1 et A8.1.2) les composés majoritaires dans le perméat sont les substances humiques qui sont à son tour difficilement biodégradable. L'origine de ces composés est l'effluent d'entrée.

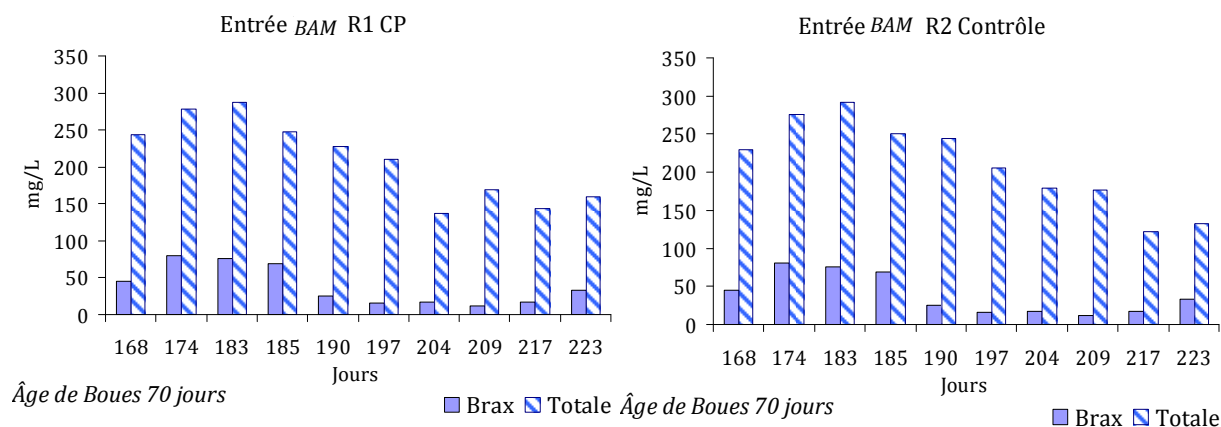


Figures A8.2.3 L'apport en DCO des exopolymères.

Les figures A8.2.4 et A8.2.5 présentent l'évolution de la concentration en substances humiques en fonction du temps dans l'eau résiduaire de Brax et dans la solution de Viandox® à l'entrée des pilotes durant les derniers jours des deux campagnes expérimentales.



Figures A8.2.4 Evolution de la concentration en substances humiques en fonction du temps dans l'eau résiduaire de Brax et dans la solution Viandox® à l'entrée des bioréacteurs. Campagne expérimentale I.



Figures A8.2.5 Evolution de la concentration en substances humiques en fonction du temps dans l'eau résiduaire de Brax et dans la solution Viandox® à l'entrée des bioréacteurs. Campagne expérimentale I.

Le Viandox® représente alors l'apport le plus important des substances humiques à l'entrée des bioréacteurs. Dans l'annexe 4 nous présentons un résumé sur les substances humiques. Selon la littérature, ces substances proviennent de la dégradation et de la transformation d'éléments végétaux. D'après la fiche technique du Viandox®, il contient du soja. Généralement, ce type de sauce est obtenue par fermentation naturelle des graines de soja. Il se peut aussi que nous soyons en train de doser d'autres molécules (telles que des colorants) comme étant des substances humiques par la méthode de dosage utilisée dans cette étude (Méthode de Lowry modifiée par Frolund, Chapitre II).

Par ailleurs, les substances humiques étant difficilement biodégradables, nous pouvons avancer que le « faible » pourcentage de élimination de la DCO par les bioréacteurs à membrane observé lors de deux campagnes expérimentales (autour de 90%) est fortement lié à la présence de composés dites « substances humiques » dans la solution Viandox®.